

Dünnschichtchromatographische Trennung und quantitative Bestimmung von Tryptophanmetaboliten im Urin

Zur Erkennung eines latenten Vitamin-B₆-Mangels beim Menschen hat sich der Tryptophan-Belastungstest mit nachfolgender Bestimmung oxidativer Tryptophanmetaboliten im Urin¹ bewährt und wegen der in letzter Zeit beschriebenen Veränderungen durch Nebennierenrindenhormone² und hormonale Kontrazeptiva³ an Bedeutung gewonnen. Die bisher geübten Methoden zur quantitativen Bestimmung von Tryptophanmetaboliten im Urin⁴⁻⁶ scheinen wegen langwieriger Extraktionsverfahren oder aufwendiger säulenchromatographischer Trennmethode für Untersuchungen an grösseren Kollektiven wenig geeignet zu sein. Die im folgenden beschriebene Methode zur quantitativen Bestimmung von Xanthurensäure (XA), Kynurensäure (KA) und 3-Hydroxyanthranilsäure (3-OHAA) bedient sich einer einfachen Aufbereitung des Urins zur Trennung der Metaboliten mittels Dünnschichtchromatographie (DC). Die Metaboliten können aufgrund ihrer Fluoreszenz im UV-Licht identifiziert werden. Die Wiederfindung liegt zwischen 79 und 99%.

Ente Weissung und Entsalzung des Urins. Eine 2–5 ml Urinprobe wird mit 5 Volumteilen 96%igem Äthanol versetzt, nach 6–8 h 10 min bei 1700 g zentrifugiert und der Rückstand mit Äthanol nachgewaschen. Die vereinigten Überstände werden am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedunstet und in 1,0 ml 0,75 M Ammoniaklösung aufgenommen. Für die Entsalzung wird der stark saure Ionenaustauscher Dowex 50 WX 8, 200–400 mesh (Serva, Heidelberg) verwendet. Ein Chromatographierohr (1,4 × 28 cm) wird 5 cm hoch mit dem Harz gefüllt.

Man überführt das Harz mit 4 N HCl im Überschuss in die H⁺-Form und entfernt die überschüssige Säure durch Waschen mit destilliertem Wasser. Das gesamte nach Ente Weissung erhaltene Volumen (1,0 ml) wird quantitativ auf die Säule gegeben. Ist die Probe in das Harz eingedrungen, wäscht man mit 20 ml dest. H₂O nach und verwirft diese Fraktion. Die Substanzen werden mit 0,75 M Ammoniaklösung eluiert. Hat man hiervon 50 ml aufgefangen, ist die Elution der Tryptophanmetaboliten vollständig erfolgt. Anschliessend wird das Eluat zur Trockne eingedampft und der Rückstand wieder in 1,0 ml einer 0,75 M Ammoniaklösung aufgenommen. Hier von werden 10 bzw. 20 µl auf die Dünnschichtplatte aufgetragen.

Chromatographie⁷. Laufmittelsysteme: 1. Butanol-(1)-Äthanol 96%ig-H₂O = 4:2:4; 2. Propanol-(2) – 0,04 M Essigsäure (pH 3,0) = 4:1. Für die Chromatographie haben sich Cellulose-Dünnschichtplatten Cel 300–10, 20 × 20 cm, Schichtdicke 0,1 mm (Macherey, Nagel und Co., Düren) bewährt. In Anlehnung an KRAUT und IMHOFF⁸ werden als Laufmittel für die 1. Laufrichtung Butanol-(1) – Äthanol – H₂O = 4:2:4 und Propanol-(2) – 0,04 M Essigsäure = 4:1 für die 2. Laufrichtung benutzt. Die zweidimensionale Entwicklung erfolgt in rechteckigen Trogkammern bei Kammervollsättigung

und Raumtemperatur bis zu einer Lauflänge von 13 cm. Nach Trocknung der Platten werden die Substanzen im langwelligen UV-Licht (366 nm) aufgrund ihrer charakteristischen Fluoreszenz identifiziert; XA und 3-OHAA fluoreszieren blau, KA grün. Im 1. Laufmittel betragen die R_f-Werte für XA 0,72, KA 0,71 und 3-OHAA 0,83, im 2. Laufmittel für XA 0,57, KA 0,51 und 3-OHAA 0,82.

Quantitative Auswertung. Zur Erzielung einer grösseren Genauigkeit und besseren Reproduzierbarkeit verwenden wir zur Elution Reaktionsgefässe und Geräte des Eppendorf-Mikrolitersystems (Netheler und Hinz, Hamburg). Nach Abkratzen der Flecke wird die Sorptionschicht in ein Eppendorf-Reaktionsgefäss überführt und mit 1,0 ml Methanol durch 5-min Schütteln auf dem Rüttler eluiert. Anschliessend zentrifugiert man in der Mikrozentrifuge 2 min bei 15000 g. Zur Bestimmung der Extinktion wird der Überstand vorsichtig mit einer Mikroliterpipette abgehoben und in eine Halbmikroküvette übertragen. Man nimmt die Messung des Eluats im Spektralphotometer beim jeweiligen Absorptionsmaximum der einzelnen Substanzen vor: dieses liegt für XA bei 240 nm, für KA bei 214 nm und für 3-OHAA bei 210 nm. (Xanthurensäure reinst, Serva, Heidelberg; Kynurensäure, Dr. Schuchardt, München; 3-Hydroxyanthranilsäure-Hydrochlorid, Fluka, Buchs, Schweiz). Das Eluat einer entsprechend grossen substanzfreien Cellulosezone dient als Blindwert. Wegen Unterschieden in der Beschaffenheit des Trägermaterials jeder einzelnen Platte kann die Auswertung der Extinktion nicht ausschliesslich anhand einer einmal ermittelten Eichkurve erfolgen. Deshalb lässt man 0,5 und 1,0 µg jeder zu bestimmenden Substanz eindimensional auf einem Randstreifen mitlaufen, eluiert und misst in der oben beschriebenen Weise. Die so gemessenen Extinktionen dienen zur Korrektur der Eichkurven.

Konzentrationen von 0,3–1,5 µg Substanz pro Bestimmungsansatz lagen im günstigsten Extinktionsbereich. Die untere Nachweisgrenze der Methode liegt bei 0,2 µg. In Bestimmungsansätzen, bei denen einem metabolitenfreien Urin 10–30 µg/ml der Substanzen zugesetzt worden waren, konnten 99% der XA, 93% KA und 79% 3-OHAA wiedergefunden werden⁹.

Summary. A sensitive thin-layer chromatographic method is described for the determination of urinary tryptophane metabolites. The method allows a simple measurement of xanthurenic, kynurenic and 3-hydroxyanthranilic acid in urine collected following a tryptophane load test.

H. FELTKAMP, W. WIERNY und F. ZILLIKEN

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität,
Nussallee 11, D-53 Bonn (Deutschland),
3 Juli 1973.

¹ D. B. COURSI, *Am. J. clin. Nutr.* 14, 56 (1964).

² H. WOLF und R. R. BROWN, *J. clin. Endocr.* 33, 838 (1971).

³ D. P. ROSE, R. STRONG, P. W. ADAMS und P. E. HARDING, *Clin. Sci.* 42, 465 (1972).

⁴ C. E. DALGLIESH, *Biochem. J.* 52, 3 (1952).

⁵ J. COTTE, M. CHETAILLE, E. POULET und J. CHRISTIANSEN, *J. Chromat.* 19, 312 (1965).

⁶ C. A. BENASSI, F. M. VERONESE und A. DE ANTONI, *Clinica chim. Acta* 17, 383 (1967).

⁷ E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie* (Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962).

⁸ H. KRAUT und U. IMHOFF, *Die Nahrung* 12, 29 (1968).

⁹ Wir danken Frau U. GERKEN für die sorgfältige Durchführung der Bestimmungen.