

Literatur

1. ARMSTRONG, M. D., K. N. F. SHAW und P. E. J. WHITE, J. biol. Chemistry, 218, 293 (1956). — 2. ROBINSON, R., Nature London, 194, 879 (1962). — 3. SMITH, I., Chromatographic techniques, William Heinemann Med. Books, London (1958). — 4. HARTMANN, F., Gastroenterologia (Basel) Suppl., 95, 182 (1961). — 5. HARTMANN, F., Klin. Wschr., 39, 273 (1961). — 6. HARTMANN, F. und W. RUGE, Dtsch. Arch. klin. Med., 208, 298 (1962). — 7. WILLIAMS, C. M. und C. C. SWEELEY, J. Clin. Endocr. Springfield, 21, 1500 (1961). — 8. WILLIAMS, C. M. und C. C. SWEELEY, Gas chromatography of urinary aromatic acids. In: Biomedical applications of gas chromatography, Hrsg. H. A. Szymanski, Plenum New York (1964). — 9. DALGLIESH, C. E., E. C. HORNING, M. G. HORNING, K. L. KNOX und K. YARGER, Biochem. J., 101, 792 (1966). — 10. HORNING, M. G., K. L. KNOX, C. E. DALGLIESH und E. C. HORNING, Analytic. Biochem. 17, 244 (1966). — 11. HORNING, M. G., E. A. BOUCHER und A. M. MOSS, J. Gaschrom., 5, 297 (1967). — 12. ARMSTRONG, M. D., A. McMILLAN und K. N. F. SHAW, Biochem. biophysica Acta, Amsterdam 25, 422 (1957). — 13. RUGE, W., Med. Klin., 61, 1671 (1966). — 14. KÄHLER, H. J., Das Karzinoid, Springer Berlin Heidelberg New York (1967). — 15. BORSCHHEL, W., F. HARTMANN, V. HEIMSOOTH und W. RUGE, Klin. Wschr., 42, 927 (1964). — 16. BRISSE, B. und F. BENDER, Klin. Wschr., 46, 108 (1968). — 17. RENNINGER, W., F. HARTMANN und W. RUGE, Dtsch. Arch. klin. Med., 209, 166 (1963). — 18. KOGUT, M. D., K. N. SHAW und G. N. DONNEL, Amer. J. Dis. Child., 113, 47 (1967). — 19. LYMAN, F. L., Phenylketonuria. Thomas Publ. Springfield Ill. (1963). — 20. GJESSING, L. R., Scand. J. Clin. Laborat. Invest., 15, 463 (1963). — 21. VON STUDNITZ, W., Klin. Wschr., 40, 163 (1962). — 22. GARRÖD, A. E., Lancet II, 73, 1908. — 23. COWARD, R. F. und P. SMITH, Nature London, 216, 520 (1967). — 24. VON STUDNITZ, W., K. ENGELMAN und A. SJOERDSMA, Clin. chim. Acta Amsterdam, 9, 224 (1964). — 25. TANIGUCHI, K. und L. R. GJESSING, Brit. Med. J. 1, 968 (1965). — 26. DEEDS, F., A. N. BOOTH und F. T. JONES, J. biol. Chemistry 227, 615 (1957).

Dr. W. Ruge
3000 Hannover
Podbielskistr. 380

Quantitative Mikrobestimmung von Dextran

I. Bestimmung in Körperflüssigkeiten¹⁾²⁾

VON W. APPEL, VERENA WIRMER und DANUTA SPRENGARD

Aus der Biochemischen Abteilung der Firma Knoll AG Chemische Fabriken, Ludwigshafen/Rhein

(Eingegangen am 27. Mai 1968)

Aus verschiedenen Methoden zur Bestimmung von Dextran (Macrodex, Rheomacrodex) in Blut (Serum) und Urin werden einzelne Schritte zu einem neuen Verfahren kombiniert: Enteiweißung mit Pikrinsäure, Isolierung des Dextrans und kolorimetrische Bestimmung nach der Anthron/ H_2SO_4 -Methode. Dieses Verfahren ist ohne Abänderung auf alle geprüften menschlichen und tierischen Körperflüssigkeiten anwendbar.

Das Verfahren wird als Milliliter- und Mikrolitermethode beschrieben. Im Milliliterverfahren werden maximal bis zu 0,5 ml, im Mikroliterverfahren bis zu 20 μ l eingesetzt. Die untere, absolute Nachweisgrenze liegt beim Mikroliterverfahren bei 2 μ g Dextran. Die durchschnittliche Genauigkeit beträgt in wäbr. Lösungen $\pm 2,2\%$ (ohne), zwischen 5,0 und 10,2% ($n = 106$) mit Isolierungsverfahren, je nach Bearbeiter und Probenzahl. In biologischem Material werden 12,9–14,8% ermittelt. Im Milliliterverfahren werden ähnliche Werte für die Genauigkeit gefunden: in wäbr. Lösungen $\pm 1,8\%$ (ohne), $\pm 6,2\%$ mit Isolierungsverfahren, und 7,2%–11,4% im biologischen Material. Die Wiederauffindquote liegt stets zwischen 95–105%.

The quantitative micro determination of dextran I. in body fluids

Individual stages from each of the various methods for the measurement of dextran (Macrodex, Rheomacrodex) in blood (serum) and urine have been combined to give a new procedure: deproteinisation with picric acid, isolation of the dextran and colorimetric determination by the anthrone/ H_2SO_4 method. This method can be used without modification on all the tested human and animal body fluids. The method is described on a millilitre and a microlitre scale. In the millilitre method a fluid volume maximally not lower than 0.5 ml is added, and in the microlitre method this volume is 20 μ l. The lower limit of detection in the microlitre method is 2 μ g dextran; the average accuracy with aqueous samples is $\pm 2.2\%$ omitting the isolation procedure, and between 5.0 and 10.2% ($n = 106$) with the isolation, depending on the operator and the number of samples. With biological material the accuracy is 12.9–14.8%. In the millilitre method, the error was similar: in aqueous solutions $\pm 1.8\%$ without isolation, $\pm 6.2\%$ with isolation, and 7.2–11.4% in biological material. The recovery was always 95–105%.

Mit der rasch wachsenden Bedeutung des Dextrans als Arzneimittel wurde ein kritischer Vergleich der bekannten Bestimmungsmethoden und die Prüfung der Brauchbarkeit für tierisches und menschliches Untersuchungs-

material erforderlich. So ist eine quantitative Bestimmung im Blut von Neugeborenen eine Voraussetzung zu Studien über die Permeabilität der Placentamembran. Die zunehmende Verwendung des niedermolekularen Dextrans, Dextran 40³⁾, in der Klinik hat weitere Fragen aufgeworfen, beispielsweise nach dem Übertritt der niedermolekularen Anteile in verschiedene Gewebs-

¹⁾ Auszugsweise vorgetragen auf dem VI. Internationalen Kongreß für klinische Chemie, München 1966 (Abstr. Nr. C 16, S. 201 des Referatenbandes).

²⁾ II. Bestimmung in Geweben (in Vorbereitung).

³⁾ Rheomacrodex, Knoll AG, Ludwigshafen/Rhein.

flüssigkeiten oder in den Verdauungstrakt vor der Elimination über die Niere.

In manchen Fällen sind nur kleinste Probemengen verfügbar, wodurch Mikroverfahren erforderlich werden. Schließlich weisen fast alle beschriebenen Bestimmungsmethoden eine ungenügende Spezifität auf, was eine Störung durch Glucose oder Glykogen ermöglicht. So versagt beispielsweise jede Routinemethode bei der Anwendung auf Magensaft, auf Humanmilch oder auf Gewebe. Aus diesen Gründen haben wir versucht, eine spezifische, richtige, genaue und empfindliche Methode zur Bestimmung von Dextran auszuarbeiten, die ohne oder nur mit geringfügigen Veränderungen auf biologisches Untersuchungsmaterial angewandt werden kann. Dabei haben wir uns in der vorliegenden Arbeit auf Körperflüssigkeiten des Menschen beschränkt, d. h. auf Fragestellungen im klinisch-chemischen Bereich.

Alle Methoden zur Bestimmung von Dextran bestehen aus drei Schritten: Abtrennung von Proteinen, Isolierung des Dextrans und quantitative Bestimmung.

Die *Abtrennung von Proteinen* (Enteiweißung) erfolgt mit Zinksulfat/NaOH (1—3), meist jedoch mit Trichloroessigsäure (4—14); manchmal wird mit 30proz. heißer KOH hydrolysiert (15); WALLENIUS (17) benutzte auch bei dextranhaltigen Lösungen Pikrinsäure.

Die meisten Autoren führen eine *Isolierung des Dextrans* durch. Manchmal erfolgt nur eine Glucosebestimmung vor und nach Hydrolyse des Dextrans (1, 2); diesen Bestimmungen haftet aber die Anfälligkeit aller indirekten Methoden an. Mitunter wird auch die Glucose enzymatisch mit Hefe (3) oder Glucoseoxydase (18) entfernt und dann eine Dextranbestimmung über Glucose angeschlossen; es verbleiben jedoch zu viel störende Substanzen. Die Isolierung des Dextrans erfolgt meist durch Fällung mit Äthanol (9—11, 14, 15, 17) oder über die schwerlöslichen blauen Kupferkomplexe (4—8), die nach der Abtrennung in EDTA gelöst werden. Auch die Fällung mit *o*-Toluidin/ H_2SO_4 wird benutzt (16).

Die *quantitative Bestimmung* des Dextrans erfolgt nach Säurehydrolyse titrimetrisch nach HAGEDORN-JENSEN (1, 2, 7), polarimetrisch (2, 14) oder turbidimetrisch (10, 11). Bei den vorzuziehenden kolorimetrischen Methoden mit Diphenylamin/HCl (3), Na-Diäthyl-dithiocarbamat (4—6, 13), Indol (8), Carbazon (12), *o*-Toluidin (16), Orcin (19) hat sich, besonders für Mikrobestimmungen, nur Anthron bewährt (3, 9, 12, 14, 15, 20—23).

Methodik

Reagenzien

Anthron für Chromatographie, z. B. Fa. Merck, Best. Nr. 1461 H_2SO_4 conc. p. a.

Äthylalkohol p. a.

Pikrinsäure reinst, z. B. Fa. Merck, Best. Nr. 620

Lösungen (die Zahlenangabe in Klammern gelten für die Mikromethode).

Achtung: peinlich saubere Geräte verwenden!

a) 0,4 (0,05) g Anthron in 200 (25) ml conc. H_2SO_4 lösen.

b) Eine Mischung von 60 (7,5) ml bidest. Wasser und 15 (1,9) ml Äthanol herstellen.

c) Lösung a) langsam unter Kühlung in Lösung b) geben und gut mischen.

d) Gesättigte Pikrinsäurelösung: eine bei etwa 60° gesättigte Lösung auf Zimmertemperatur abkühlen und über dem Bodenkörper aufbewahren.

e) Dextranstandardlösung:

Dextran wird 2 Stdn. bei 110° und 15 mm Hg über P_2O_5 absolut getrocknet. 100,0 mg werden in 50,0 ml dest. Wasser gelöst ($\approx 2,00$ mg/ml).

Achtung: Lösungen a)—c) frisch vor dem Versuch herstellen.

Arbeitsvorschriften

Millilitermethode

0,50 ml Probenflüssigkeit werden in ein Zentrifugenglas, das 4,0 ml Pikrinsäurelösung enthält, gegeben und 10 Min. (Raumtemperatur, 3000 U/Min.) zentrifugiert.

Zu 1,0 ml des klaren Überstandes fügt man 5,0 ml vorgekühltes Äthanol und läßt 1 Std. im Kühlschrank bei + 4° stehen. Danach wird in der Kühlzentrifuge 15 Min. bei 12 000 U./Min. zentrifugiert⁴⁾, im Vakuum (40 mm Hg) bei 50—60° etwa 15 Min. getrocknet und der Trockenrückstand in 1,5 ml Wasser gelöst; 1,0 ml werden zur kolorimetrischen Bestimmung im 25 ml Schliff-Erlenmeyerkolben mit 10,0 ml der Lösung c) versetzt. Die Kölbchen werden geschüttelt, genau 10 Min. im siedenden Wasserbad belassen und sofort im Eisbad etwa 4 Min. abgekühlt. Die Extinktion der Farblösung wird bei 620 nm und 1,0 cm Schichtdicke gegen Wasser gemessen (E_x). Als Leerwerte dienen 0,5 ml Proben des zu untersuchenden Materials, das kein Dextran enthält (E_0). Zur Präzisionskontrolle werden bei jeder Serie 0,5 ml der Standardlösung mitgeführt (E_{St}). Liegen die E_{St} -Werte außerhalb des $x \pm 2s$ -Bereiches im Kontrollsystem, so wird die zugehörige Versuchsreihe wiederholt oder, falls dies nicht möglich ist, bei der Berechnung eine Korrektur angebracht. Zur Berechnung der Dextrankonzentration wird aus den Werten für $E = E_x - E_0$ aus einer Eichkurve der Dextrangehalt in μg ermittelt und auf μg Dextran pro ml Probelösung umgerechnet.

Mikrolitermethode

10 μl Probelösung werden in ein Mikrozentrifugenglas, das 100 μl gesättigte Pikrinsäure enthält, gegeben, gut gemischt und 5 Min. in der Mikrozentrifuge zentrifugiert. 50 μl des Überstandes werden in ein Mikroröhrchen überführt, 300 μl Äthanol zugegeben, gut gemischt und 1 Std. bei -10° bis -20° (z. B. Kältruhe) belassen. Der Niederschlag wird in der Mikrozentrifuge (kalt, durch Einstellen von mit Eis gefüllten kleinen Bechergläsern vorgekühlt) 2 Min. zentrifugiert, der Überstand (mittels Spritze) bis auf etwa 20 μl abgehoben, der Dextranrückstand 10—15 Min. bei 50—60° im Vakuum (Trockenschrank) getrocknet und mit 70 μl bidest. Wasser aufgenommen. 50 μl dieser Lösung werden in ein Mikroschliffglasröhrchen pipettiert, mit 500 μl Anthronlösung versetzt, sofort 10 Min. (genau!) im siedenden Wasserbad belassen, sofort im Eisbad abgekühlt und in einer Mikroküvette (d = 1,0 cm) bei 620 nm gegen Wasser gemessen. Leer- und Standardwerte wie oben.

Prüfsubstanzen

Alle Untersuchungen wurden mit in der Klinik verwendeten Dextranen durchgeführt, deren Spezifikationen aufgrund eigener Analysendaten in Tabelle 1 zusammengestellt sind.

Ergebnisse

Eichkurven

Es wurden Eichkurven für Dextran gelöst in Wasser und jedem Untersuchungsmaterial (Serum, Harn usw.)

⁴⁾ Notfalls kann auch längere Zeit bei geringeren Drehzahlen zentrifugiert werden. Dabei muß Vorsorge getroffen werden, daß die Temperatur nicht höher als 4° C ansteigt (Kühlraum, Vorkühlen von Gehängen, Bechern und Gläsern).

Tab. 1 Charakteristika der untersuchten, in der Klinik angewendeten Dextrane
 Die Bestimmungen von \bar{M}_w erfolgten durch Lichtstreuung im Photo-niodiffusometer „Sofica“, von \bar{M}_n titrimetrisch nach der Somogyi-Phosphat-Methode, von $[\eta]$ im Ubbelohde-Viskosimeter (25,00 ± 0,02°) und des Verzweigungsgrades titrimetrisch
 \bar{M}_v berechnet sich nach der Gleichung $[\eta] = K \times M_v^\alpha$ ($K = 2,18, \alpha = 0,43$ für das verwendete Dextran)
 Die fraktionierte Fällung wurde mit Methanol nach der „American Military Medical Purchase Description“ durchgeführt, die fraktionierte Extraktion säulenchromatographisch mit Kieselgur. Molekulargewichtsverteilungskurven wurden durch Gelfiltration an Sephadex G 100 aufgestellt

Dextran		Dextran 70* (Macrodex)	Dextran 40* (Rheomacrodex)
Dextrancharge		DRI-T 5598	RMI-T 6636
Gewichtsmittel des Mol. Gew.	\bar{M}_w	69 500	39 100
Zahlenmittel des Mol. Gew.	\bar{M}_n	38 900	27 200
Viskositätsmittel des Mol. Gew.	\bar{M}_v	68 000	33 000
Intrinsic-Viskosität $[\eta]$		0,263	0,194
Verzweigungsgrad (1:6-Bindung)		92,7%	94,2%
Feuchtigkeitsgehalt		5,41%	4,54%
Molekulargewichtsverteilung (24) Hochmolekulare Fraktion			
fraktionierte Fällung	$\bar{M}_w =$	108 600 (13,8%)	51 300 (8,0%)
fraktionierte Extraktion	$\bar{M}_w =$	118 000 (10%)	58 000 (10%)
Niedermolekulare Fraktion			
fraktionierte Fällung	$\bar{M}_w =$	28 500 (8,4%)	18 400 (8,8%)
fraktionierte Extraktion	$\bar{M}_w =$	25 000 (10%)	15 000 (10%)
Uneinheitlichkeitszahl	\bar{M}_w/\bar{M}_n	1,83	1,44

* Hersteller Fa. Knoll AG, Ludwigshafen/Rhein.

mit und ohne Durchführung des Isolierungsverfahrens jeweils für die „Makro“- und „Mikro“-Methode aufgestellt. Als Beispiel zeigt Abbildung 1 die Eichkurve einer wäbr. Dextranlösung im Mikromaßstab nach Durchführung des Isolierungsverfahrens. Die Eich-

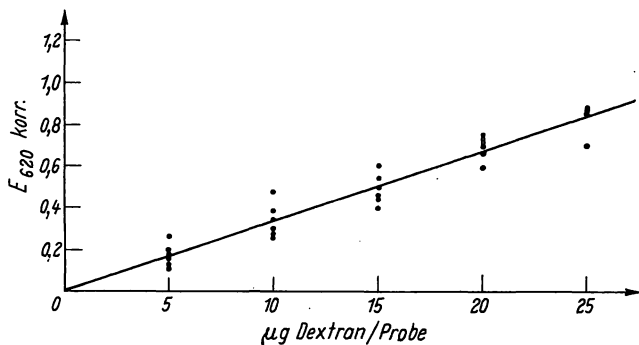


Abb. 1

Dextran-Eichkurve, Mikroliteranalyse (n = 7)
 Dextran in wäbr. Lösung nach der Mikroliteranalyse mit Isolierungsverfahren
 Schichtdicke 1 cm; Wellenlänge 620 nm; Extinktionen korrigiert gegen Reagenzienleerwert ($\Delta E = E_x - E_0$)

kurve der Anthronbestimmung wäbr. Dextranlösungen ohne das Isolierungsverfahren ist mit der in Abbildung 1 dargestellten identisch. Das Isolierungsverfahren an sich bedingt keine Verluste.

Das erarbeitete Isolierungsverfahren erweist sich für die untersuchten Körperflüssigkeiten als so universell anwendbar, daß alle Eichkurven innerhalb der Meßfehlergrenzen trotz verschieden hoher Leerwerte E_0 zur Deckung gebracht werden können. Die so erhaltenen, materialunabhängigen Eichkurven sind als Mittelwerts-

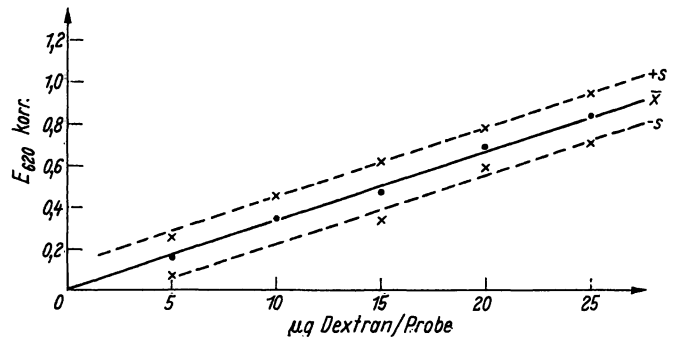


Abb. 2

Dextran-Eichkurve, Mikroliteranalyse
 Eichwerte für alle Körperflüssigkeiten in einer Mittelwertkurve mit den Standardabweichungen ± s
 Schichtdicke 1 cm; Wellenlänge 620 nm.
 Extinktionen korrigiert gegen Reagenzienleerwert ($\Delta E = E_x - E_0$)

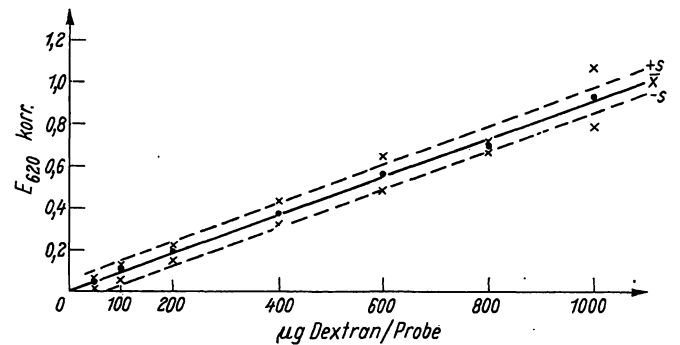


Abb. 3

Dextran-Eichkurve, Milliliteranalyse
 Schichtdicke 1 cm; Wellenlänge 620 nm
 Extinktionen korrigiert gegen Reagenzienleerwert ($\Delta E = E_x - E_0$)

kurven ($\bar{E}_x - \bar{E}_0$) mit den zugehörigen Standardabweichungen ± s in den Abbildungen 2 und 3 für die „Makro“- bzw. „Mikro“-Methode dargestellt.

Genauigkeit (Tab. 2)

Die Fehlerbreite F beträgt bei der „Makro“-Bestimmung in wäbr. Lösungen im optimalen Meßbereich, (z. B. $E_x = 0,4 \hat{=} 400 \mu\text{g Dextran}$) ± 1,8% (ohne) bzw. ± 6,2% (mit dem Isolierungsverfahren). Bei der Bestimmung in biologischem Material bleibt F etwa gleich, bei Serum beispielsweise ± 7,2% (n = 40). Im Verlauf

Tab. 2

Genauigkeit
 „Verfahren“ bedeutet Bestimmung in wäbrigen Lösungen nach Durchführung des gesamten Isolierungsverfahrens
 Bei der Milliliterbestimmung („Makro“) wurden stets 600 µg Dextran in 0,5 ml Probelösung eingesetzt, bei der Mikroliteranalyse stets 20 µg in 0,01 ml; bei den mit + gekennzeichneten Zahlen waren 400 µg Dextran eingesetzt worden

Probe	„Makro“		„Mikro“		
	n	\bar{E}_0	n	\bar{E}_x	s
Wasser	15	0,020	15	0,357 ⁺	0,006
„Verfahren“	13	0,029	14	0,400 ⁺	0,025
Serum	12	0,008	40	0,554	0,040
Harn	10	0,030	34	0,548	0,063
Speichel	10	0,016	8	0,572	0,046
Wasser	15	0,031	15	0,690	0,080
„Verfahren“	15	0,048	15	0,665	0,065
Serum	10	0,067	54	0,706	0,098
Milch	13	0,099	15	0,588	0,087
Liquor	15	0,033	15	0,666	0,086

* In Nachuntersuchungen 5,0—10,2% (n = 106), s. Abschnitt „Genauigkeit“.

Tab. 3
Wiederauffindversuche: konstante Probevolumina, verschiedene Dextranmengen

Probe	„Makro“				„Mikro“			
	eingesetzt		gefunden		eingesetzt		gefunden	
	n	µg	µg	x %	n	µg	µg	x %
Wasser	16	400	425	106,3	15	20	20	100,0
„Verfahren“	16	400	447	111,7	15	20	21	105,0
Serum	8	50	45	90,0	14	20	18	90,0
Serum	40	600	615	102,5				
Harn	16	50	50	100,0				
Harn	34	600	580	96,6				
Speichel	5	600	617	102,8				
Milch					15	20	18	90,0
Liquor					15	20	21	105,0
Magensaft	4	600	600	100				
Darmsaft	2	200	190	95				

klinischer Untersuchungen an über 1000 Harn- und Serumproben von Säuglingen und Kleinkindern mittels „Mikro“-Methode wurde bei der Vielfachanalyse (n = 54) einer Standardlösung eine Fehlerbreite von ± 5,0% gefunden. Bei der Analyse von Standardlösungen aus verschiedenen Chargen (n = 60) über 2 Monate hinweg ergab sich ein Vertrauensbereich von V = ± 10,2%; diese Werte wurden von verschiedenen Untersuchern erhalten.

Wiederauffindversuche (Tab. 3)

Bei der „Makro“-Methode beträgt die Wiederauffindquote bei wäbr. Lösungen 106,3 ± 1,8% ohne bzw. 111,7 ± 6,2% mit Anwendung des Isolierungsverfahrens (400 µg Dextran). Gleiche Ergebnisse erhält man bei biologischem Material. An der unteren Nachweisgrenze, 50 µg Dextran, liegt die Wiederauffindquote gleich hoch. Auch bei der „Mikro“-Methode werden durchweg 90—105% nach Einsatz von 20 µg Dextran wiedergefunden.

Die Ausbeute ist unabhängig vom Probevolumen; im Bereich von 0,1—1,6 ml finden sich bei „Makro“- und „Mikro“-Methoden Auffindquoten von 99,7%. Die Wiederauffindquoten sind leerwertunabhängig (Tab. 4): Parallelanalysen von je 600 µg Dextran in fünf verschiedenen Humansenen lieferten im Mittel 97,1%, obwohl die Leerwerte E₀ von 0,009 bis 0,206 schwankten. Analog untersuchte Harnproben ergaben rund 94,4% Ausbeute. Die Wiederauffindquoten liegen also bei verschiedenen Variationen stets im Bereich von 95—105%.

Nachweisgrenzen und Empfindlichkeit (Tab. 6)

Die *Nachweisgrenze* hängt bei konstanter Methodik wesentlich von der Höhe und Streuung der Leerwerte ab. In den Tabellen 5a und 5b sind die Werte für E₀ und s als „Dextran pro ml Körperflüssigkeit“ ausgedrückt. Als Maß für die Nachweisgrenze wird eine Wahrscheinlichkeit von p = 0,05 angenommen, die erreicht werden muß, wenn eine bestimmte Dextranmenge in mehr als 95% aller Fälle nachweisbar sein soll. Die in Tabelle 5a aufgeführten Werte für t · s (in µg/ml) stellen die so errechneten Nachweisgrenzen dar. Demnach können aus einer Probe allgemein zwischen 9 und 43 µg Dextran/ml Körperflüssigkeit, im Mittel 28 µg, im „Makroverfahren“ nachgewiesen werden. Für das „Mikroverfahren“ lauten die entsprechenden Zahlen 54—217 µg/ml.

Für unbekannte Proben, deren Leerwert E₀ nicht bekannt bzw. bestimmbar ist, ist es zur Festlegung einer allgemeinen Nachweisgrenze notwendig, als Basis nicht den Leerwert der einzelnen Probe E₀, sondern den Mittelwert \bar{E}_0 aus einer möglichst großen Stichprobenzahl zu bestimmen. Wir haben dies nur für sehr kleine

Tab. 4
Wiederauffindversuche: verschiedene Probevolumina, konstante Dextranmengen

Probe	„Makro“: Probevolumen in ml														
	0,1			0,2			0,4			0,8			1,6		
	einges.	gef.	%	einges.	gef.	%	einges.	gef.	%	einges.	gef.	%	einges.	gef.	%
Serum	600	600	100	600	585	97,5	600	583	97,0	600	725	121	600	735	123,0
Harn	600	570	95,0	600	571	95,2	600	575	96,0	600	625	104	600	640	107,0
Speichel	600	590	98,3	600	567	94,6	600	584	97,3	600	600	100	600	565	94,3

Probe	„Mikro“: Probevolumen in µl											
	5			10			20			40		
	einges.	gef.	%	einges.	gef.	%	einges.	gef.	%	einges.	gef.	%
Liquor	20	16,5	82,5	20	15,0	75,0	20	18,0	90,0	20	20,0	100
Milch	20	20,5	102	20	20,6	103	20	21,0	105	20	23,5	115

Tab. 5a

„Meßbare“ Empfindlichkeit bei gleichen Proben, mehrmals analysiert
n = Zahl der Messungen; t = Signifikanzquotient für p = 0,05; t · s = „meßbare“ bzw. „realisierbare“ Empfindlichkeit; (\bar{E}_0) = Mittelwert der Leerwerte (\bar{E}_0) aus n Messungen; (\bar{E}'_0) = Mittelwert der Leerwerte (E'_0) aus n Individualproben; s = Standardabweichung
Alle Werte für (\bar{E}_0), (\bar{E}'_0), s und t · s sind unter Verwendung der entsprechenden Eichkurven in „µg Dextran pro ml Körperflüssigkeit“ umgerechnet

Probe	„Makro“ (0,5 ml)					„Mikro“ (10 µl)				
	n	(\bar{E}_0)	s	t	t · s	n	(\bar{E}_0)	s	t	t · s
Wasser	15	50	20	2,14	42,8	15	100	25	2,14	54
„Verfahren“	13	60	10	2,16	21,6	15	100	50	2,14	107
Serum	12	20	10	2,20	22,0	10	200	50	2,26	113
Harn	10	60	20	2,26	45,2	—	—	—	—	—
Milch	—	—	—	—	—	13	300	100	2,17	217
Liquor	—	—	—	—	—	15	100	50	2,14	107
Speichel	10	30	4	2,26	9,1	—	—	—	—	—

Tab. 5b

„Realisierbare“ Empfindlichkeit bei verschiedenen Einzelproben (Individualproben). Erklärungen s. Abb. 5a

„Makro“	n	(E ₀)	s	t	t · s
Serum	14	100	160	2,16	345,8
Harn	15	80	25	2,14	53,5
Magensaft	10	100	60	2,26	135,6
Darmsaft	10	190	30	2,26	67,8
Speichel	8	20	8	2,36	18,8
„Mikro“					
Serum	10	300	200	2,26	452,0

Tab. 6

Physiologischer Streubereich der Leerwerte

„Makro“	n	E ₀	E ₀ ± 2s
Serum	14	0,0450	0,045 ± 0,048
Harn	15	0,0388	0,039 ± 0,046
Magensaft	10	0,0831	0,083 ± 0,110
Darmsaft	10	0,0780	0,078 ± 0,024
Speichel	8	0,0690	0,009 ± 0,008
„Mikro“			
Serum	10	0,1140	0,114 ± 0,117

Probenzahlen, n = 15, orientierend durchgeführt (Tab. 5b). Die „realisierbare“ Empfindlichkeit schwankt hierbei sehr stark zwischen 19 µg/ml Speichel bis 346 µg/ml Serum („Makro“). Die absoluten Zahlen der Leerwerte sind in Tabelle 7 aufgeführt. Wir möchten als „meßbare“

Tab. 7

Leerwerte E₀ mit und ohne Enteiweißung

Probe	Enteiweißung	
	mit	ohne
Serum	0,01	0,49—0,76
Harn	0,03	0,60—0,73
Milch	0,09	0,50—0,67
Liquor	0,03	0,09—0,15
Magensaft	0,20—5,7	0,22—6,0

Nachweisgrenze im Mittel etwa 30 µg Dextran pro 1,0 ml Probenflüssigkeit im „Makro“-Verfahren, etwa 100 µg Dextran pro 1,0 ml Probenflüssigkeit im „Mikro“-Verfahren annehmen. Bei maximal einsetzbaren Volumina von 0,5 bzw. 0,02 ml bedeutet dies eine mit p = 0,05 sicher nachweisbare absolute Dextranmenge von 15 µg beim „Makro“- und von 2 µg Dextran beim „Mikro“-Verfahren.

Prüfung der Notwendigkeit einzelner Verfahrensschritte

Wegfall der Enteiweißung mit Pikrinsäure

Unterläßt man die Enteiweißung und fällt sofort mit Äthanol, so steigen die Leerwerte E₀ stark an, der Nachweis wird unempfindlicher (Tab. 7). Außerdem sinkt die Ausbeute (Tab. 8). Die Verluste sind von Fall zu Fall verschieden, können jedoch so hoch werden, daß die quantitative Bestimmung überhaupt fraglich wird.

Wegfall der Äthanol-fällung

Die Anthronreaktion wird durch nicht entfernte Pikrinsäure gestört. Wird sie direkt im Pikrinsäurefiltrat von Harn durchgeführt, so entstehen dunkelgraue bis

Tab. 8
Wiederauffindquote

Zugesetzt zu 0,5 ml	Gefunden			
	Speichel		Harn	
	µg	%	µg	%
12,5	0	0	8	64
25	15	60	3	12
50	55	110	12	24
100	140	140	82	82
200	205	103	140	70

-braune Färbungen. Die Isolierung des Dextrans über die Äthanol-fällung ist auch deshalb nicht zu umgehen, weil damit gleichzeitig störende biologische Substanzen abgetrennt werden. Als Beispiel hierfür seien anhand des Magensaftes die Extinktionen E_x, ausgedrückt in „mg Dextran/ml Magensaft“ aufgeführt, die bis zu einer Zehnerpotenz unterschiedlich sind.

1. Reagenzienleerwert: 0,007
2. Reagenzienleerwert, papierfiltriert: 0,080
3. Magenschleim ohne Äthanol-fällung: 0,780
4. Magensaft ohne Äthanol-fällung: 0,120
5. Magensaft mit Äthanol-fällung: 0,011
6. Magensaft mit Äthanol-fällung, stark schleimhaltig (n = 12): 0,014 ± 0,008

Weitere Körperflüssigkeiten

Wir untersuchten zur Orientierung zwei pathologische Körperflüssigkeiten, einen Hydroceleninhalt und ein Schleimbeutelprodukt. In beiden Fällen sind Eichkurven, Wiederauffindquoten und Genauigkeit gleich denen bei Harn und Serum. Die Eichkurven sind daher in Abbildung 2 bzw. 3 mit eingeschlossen.

Das gleiche gilt auch für verschiedene pathologische Blutseren, z. B. bei hohem Gehalt an Bilirubin, Cholesterin oder γ-Globulin. Ausführlichere Untersuchungen haben wir aus Gründen der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Diese Beispiele zeigen die Anwendbarkeit der beschriebenen Methode bei verschiedenen Körperflüssigkeiten.

Eine sehr große Anzahl von Analysen wurde an Serum und Harn verschiedener Laboratoriumstiere durchgeführt. Alle Eichkurven liegen gleich, eine Abänderung des Verfahrens brauchte nicht durchgeführt zu werden.

Methodische Hinweise

Besondere Beachtung ist bei Filtrationen der Qualität der Filterpapiere zu schenken, z. B. bei der Abtrennung des Magenschleimes vom Magensaft oder der Klärung von Milch. Die besten Ergebnisse erhielten wir mit dem Filter Nr. 1221 der Fa. Schleicher und Schüll. Bei pathologischem oder verunreinigtem Untersuchungsmaterial ist zu bedenken, ob bzw. in welchem Umfang anthronpositives Material vorhanden ist. Hier ist nach Möglichkeit eine Leerprobe vor bzw. einige Tage nach der Dextranapplikation zu analysieren. Größter Wert ist auf die Sauberkeit der Glasgeräte zu legen. Die verwendete Schwefelsäure ist ausschließlich für die Anthronreaktion zu reservieren. Alle Lösungen sollten frisch angesetzt werden.

Tab. 9
Vergleich der Nachweisgrenzen (μg Dextran pro ml Flüssigkeit)

Autoren	Wasser	Blut	Serum	Harn	Magensaft	Duodenalsaft
GOHR (1)		50				
WALLENIUS (3)	50	50	50	50		
HINT (4)		250	250			
SÜLLMANN (7)	500	600		5000		
ROE (9)	10	25	25			
JACOBSSON (10)		1500				
METCALF (11)			10	10		
DAVIES (14)			16			
BOURRILLON (19)			50	50		
SCOTT (22)	10					
GRÖNWALL (23)					10	<100
Unser Verfahren	„Makro“: 28 μg (untere Grenze: 15 μg in 0,5 ml) „Mikro“: 120 μg (untere Grenze: 2 μg in 0,02 ml)					

Tab. 10
Vergleich der Wiederauffindquoten (in % des Zusatzes)

Autoren	Wasser	Blut	Serum	Plasma	Harn	Faeces	Magensaft
GOHR (1)		95—105			96—104,4		
WALLENIUS (3)							
SÜLLMANN (7)		89,5—113		91—108	86—111	99—111	
GOLDBERG (8)		90					
ROE (9)	67	103,3			101		
METCALF (11)			99,6—100,2		100,5 \pm 4,01,		
TROELL (12)							96 \pm 2
BOURRILLON			98—100		96—100		
Unser Verfahren	106,3 \pm 1,8		102,5 \pm 7,2		96,6 \pm 11,4		102,0 \pm 12,0

Tab. 11
Vergleich der Genauigkeit

Autoren	Genauigkeit	Dextranmenge	Bemerkungen
WALLENIUS (3)	\pm 1,8%		—
HINT (4)	\pm 10,6%	0,25 mg	—
SÜLLMANN (7)	\pm 8,7%	0,50 mg	in rein wäbr. Lösungen
ROE (4)	\pm 0,6%		in rein wäbr. Lösungen, n = 12!
JACOBSSON (10)	\pm 2,0%		—
METCALF (11)	\pm 4,3%		Serum
TROELL (12)	\pm 3,6%		—
SCOTT (22)	s = 0,0029		n = unbekannt
GRÖNWALL (23)	\pm 2,5%		—
Unser Verfahren	\pm 7,2—11,4%	0,015—0,5 mg	in biolog. Material
	\pm 1,8%	0,015—0,5 mg	in wäbr. Lösungen
	\pm 14,0%	0,002—0,05 mg	in biolog. Material
	\pm 2,2%	0,002—0,05 mg	in wäbr. Lösungen

Diskussion

Es sollte eine Bestimmungsmethode für Dextran in biologischem Material erarbeitet werden. Diese sollte den Anforderungen nach Spezifität, Richtigkeit, Genauigkeit, Empfindlichkeit und universeller Anwendbarkeit standhalten und sowohl im Milliliter- als auch im Mikrolitermaßstab durchführbar sein.

Die einzelnen Stufen des beschriebenen Verfahrens sind in der Literatur bekannt, nicht aber unseres Wissens ihre Kombination zur Gesamtmethode. Eine sorgfältige, statistische Prüfung ihrer Leistungsfähigkeit und ihrer universellen Anwendbarkeit fehlt bisher. Eine echte Mikroliteranalyse des Dextrans (Ultramikroverfahren) ist bislang noch nicht beschrieben worden.

Die Tabelle 9 zeigt — auszugsweise — den Vergleich der Nachweisgrenzen, Tabelle 10 den der Wiederauffindquoten und Tabelle 11 den der Genauigkeiten bei verschiedenen Autoren.

Das beschriebene Verfahren genügt unseres Erachtens daher den oben aufgestellten Anforderungen.

Wir danken Herrn Prof. Dr. Dr. V. KLINGMÜLLER, Direktor des Klin.-Chem. Instituts der Städt. Krankenanstalten (Klinikum Mannheim) sehr für die uneingeschränkte Hilfe bei der Beschaffung der Prüfflüssigkeiten, vor allem auch für die Beratung bei der Diskussion der Ergebnisse.

Herrn Dr. LÖSEL, Ludwigshafen/Rhein, danken wir für seine Unterstützung bei Analysen einzelner, besonders auch pathologischer Flüssigkeiten.

Literatur

- GOHR, H., A. BOLTE und H. LANGENBERG, sen., Zschr. inn. Med., Leipzig, 8, 773 (1953). — 2. KLEVAS, S., Svensk kem. Tidskr., 56, 262 (1944). — 3. WALLENIUS, G., Acta Soc. med. Upsal., 59, 69 (1953). — 4. HINT, H. und G. THORSEN, Acta chem. Scand., 1, 808 (1947). — 5. FRIDBERG, U., W. GRAF und B. ÅBERG, Scand. J. clin. Laborat. Invest., 3, 221 (1951). — 6. ROSENFELD, E. L. und A. S. SAIENKO, Biochim., Moskva, 28, 552 (1963). — 7. SÜLLMANN, H., Helv. Med. Acta, 19, 19 (1952). — 8. GOLDBERG, M., R. D. CRANE und H. POPPER, Amer. J. Path., 939 (1947). — 9. ROE, J., J. biol. Chemistry, 208, 889 (1954). — 10. JACOBSSON, L. und H. HANSEN, Scand. J. Clin. Laborat. Invest., 4, 352 (1952). — 11. METCALF, W. und L. M. ROUSSELOT, J. Laborat. Clin. Med.

- S. Louis, 40, 901 (1952). — 12. TROELL, L. und B. ÅBERG, Scand. J. Clin. Laborat. Invest., 4, 4 (1952). — 13. ENGSTRAND, L. und B. ÅBERG, Lancet, London, 258, 1071 (1950). — 14. DAVIES und RICKETTS, Brit. J. Pharmacol., 21, 221 (1963). — 15. BLOOM, W. L. und M. L. WILLCOX, Proc. Soc. exp. Biol. Med., 76, 3 (1951). — 16. REDEI, A. und S. NAGY, Nature, London, 191, 173 (1961). — 17. WALLENIS, G., unpubliziert. — 18. APPEL, W., unpubliziert. — 19. BOURRILLON, R., Compt. rend. Soc. biol., Paris, 147, 238 (1953). — 20. DURHAM, W., W. BLOOM, G. LEWIS und E. MANDEL, Publ. Hlth. Rep., Wash. 65, 670 (1950). — 21. DIMLER, R. J., H. A. DAVIES, G. J. GILL und C. E. RIST, Analytic. Chem., 26, 1142 (1954). — 22. SCOTT, T. A. und E. H. MELVIN, Analytic Chem., 25, 1656 (1953). — 23. GRÖNWALL, A. und K. WIKSTRÖM, Acta Soc. med. Upsal., 59, 24 (1953). — 24. SCHULZ, G. V., Makromolekulare Chem., 5, 83 (1950).

Dr. W. Appel
6700 Ludwigshafen/Rh. 2
Knoll AG, Postfach

The non-destructive detection of amino acids on thin-layer chromatograms using 1-Fluor-2,4-Dinitrobenzene¹⁾

By G. PATAKI, J. BORKO and A. KUNZ

From the Analytical Department, Laboratory for Chromatography, Robapharm Ltd. Basle, Switzerland

(Eingegangen am 4. Juni 1968)

An improved method for the *non-destructive* detection of amino acids separated on thin-layer chromatograms is described. The reaction of amino acids with 1-Fluor-2,4-Dinitrobenzene *in situ* allows the detection of 10 nMoles on *two-dimensional* and 0.5 to 1 nMoles on *one-dimensional* chromatograms. The technique makes possible *reaction chromatography* and *multidimensional chromatography* of amino acids, i. e. the *more unambiguous* identification in complex mixtures.

Eine verbesserte Methode zum *zerstörungsfreien* Nachweis von Aminosäuren auf Dünnschicht-Chromatogrammen wird beschrieben. Die Umsetzung von Aminosäuren mit 1-Fluor-2,4-Dinitrobenzol *in situ* erlaubt den Nachweis von 10 nMolen in *zweidimensionalen* und 0,5 bis 1 nMolen in *eindimensionalen* Chromatogrammen. Die Technik ermöglicht die *Reaktionschromatographie* und die *multidimensionale Chromatographie* von Aminosäuren, d. h., eine *eindeutige* Identifizierung in komplexen Gemischen.

The non-destructive detection of amino acids on thin-layer chromatograms, using 2,4-Dinitrofluorbenzene (DNFB), was reported in a preliminary communication (2). The technique described in this paper (2) has been subsequently used, in an improved version, to detection and reaction chromatography of amino acids (3, 4). In the present paper the *improved procedure* will be described.

DNFB-amino acids (Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg and Mann Research Laboratories, New York)
Amino Acid Standard solutions set No. 1, Catalogue No. 2058 (Shandon, London)
Methylalcohol (Merck, Art. 6009)
Sodium hydroxide (Merck, Art. 6496)
Chloroform (Merck, Art. 2445)

Reagents

DNFB-solution: 1% (w/v) in absolute methyl alcohol (the solution must be freshly prepared!) (5)
1M Bicarbonate-buffer pH 8.8: 8.4 g NaHCO₃ dissolve (without heating!) in distilled water, pH adjusted to 8.8 with 2N NaOH, and made up to 100 ml with distilled water (5)
Ninhydrin-solution: 0.3 g Ninhydrin + 100 ml n-Butanol + 3 ml glacial acetic acid (5)
FOLIN's Reagent: 0.2 g β-Napthoquinone-n-sulfonic acid-sodium + 100 ml 5% Na₂CO₃-solution (5)

Preparation of the layers

Glass plates as well as plastic foils are coated with *purified* MN-300-cellulose (6, 7), and with silica gel G-Starch (5).

Chromatography

Two-dimensional development on cellulose was carried out according to JONES and HEATHCOTE (8). *First dimension*: isopropanol/formic acid/water (80:4:20 v/v), and after drying with a stream of cold air (1 hour), tert-butylalcohol/ethylmethylketone/25% ammonia/water (5:3:1:1 v/v) in the *second dimension*. All runs were *without* chamber saturation.

One dimensional chromatography on silica gel was performed with chloroform/methanol/25% ammonia (2:2:1 v/v) (5) All runs were *with* chamber saturation.

Detection with DNFB

When the chromatography is complete, the layer is dried (15 min. in a stream of warm air) and cooled to room temperature. The

Material and Methods

Material

MN-300-cellulose (Macherey, Nagel + Co. Düren)
Kieselgel G (Merck, Art. 7731)
Plastic foils for TLC, DC GA 1190 (Galenopharm, Geneva)
Toronto starch (Bender + Hobein, Zurich)
1-Fluor-2,4-Dinitrobenzene puriss (DNFB) (Fluka, Buchs, Switzerland)
Ninhydrin (Hoffmann La Roche, Basle)
Sodium carbonate (Merck, Art. 6391)
Sodium hydrogen carbonate (Merck, Art. 6329)
n-Butanol (Merck, Art. 9628)
Isopropanol (Merck, Art. 9634)
Formic Acid (Merck, Art. 264)
tert-Butylalcohol (Merck, Art. 9629)
Ethylmethylketone (Merck, Art. 9708)
Glacial Acetic Acid (Merck, 90063)
25% Ammonia (Merck, Art. 5432)
β-Napthoquinone-4-sulfonic acid-sodium (Merck, Art. 6531)

¹⁾ 9th communication on "Application of thin-layer chromatography in sequence analysis of peptides". 8th communication cf. Reference (1).