

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 18, 1980, pp. 567-570

Quantitative Bestimmung der *o*-Phthaldialdehyd-Derivate von Noradrenalin, Dopamin und Normetanephrin aus dem Urin mit einem Aminosäureanalysator

Von K. Olek, S. Uhlhaas und P. Wardenbach

Institut für Humangenetik der Universität Bonn

(Eingegangen am 6. November 1979/27. März 1980)

Zusammenfassung: Mit einem handelsüblichen Aminosäureanalysator werden Noradrenalin, Dopamin und Normetanephrin aus dem Urin an einem Kationenaustauscher (DC 6A Durrum) säulenchromatographisch getrennt. Nach der Auftrennung erfolgt die Derivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd mit dem in der Aminosäurechromatographie üblichen Pumpsystem. Die quantitative Messung wird mit einem Fluorimeter durchgeführt. Zur Vorreinigung werden Fertigsäulen verwendet (Bio-Rad).

Quantitative determination of the o-phthaldialdehyde derivatives of noradrenaline, dopamine and normetadrenaline in urine with an amino acid analyzer

Summary: Noradrenaline, dopamine and normetadrenaline in urine are separated by a cation-exchange resin (DC 6A, Durrum) and a commercially available amino acid analyzer. After separation, the *o*-phthalaldehyde derivatives of the compounds are formed by the usual pumping system and are quantified with a fluorimeter. Pre-packed ion-exchange columns (Bio-Rad, Munich) are used for purification and fractionation of the urine samples.

Einführung

Methoden zur quantitativen Bestimmung biogener Amine in biologischen Flüssigkeiten erfordern eine große Nachweisempfindlichkeit und Spezifität. Letzteres gilt vor allem für Analysen aus dem Urin, der viele verwandt reagierende Stoffe enthält.

Von den heute zur Verfügung stehenden Analysemethoden genügen diesen Ansprüchen am besten die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)-Kopplung (1, 2) und radioenzymatische Verfahren (3, 12). Deren geringe Verbreitung dürfte sowohl auf den hohen finanziellen und apparativen Aufwand als auch auf die Forderung nach besonders versiertem Laborpersonal zurückzuführen sein.

Praktikable Alternativen sind zu erhoffen von der Hochdruckflüssigchromatographie mit fluorimetrischer Detektion und der Kapillar-Gaschromatographie in Verbindung mit einem Elektroneneinfangdetektor. Für die fluoreszierenden Dansyl-, Trihydroxyindol-, *o*-Phthaldialdehyd- und Fluorescaminderivate liegen gründliche Studien vor (4, 5, 6, 7), keines dieser Verfahren ist bisher für die

klinisch-chemische Routine genügend ausgereift. Die Dansyl-derivate sind zersetzlich; die Trihydroxyindol-Reaktion erfordert einigen technischen Aufwand; *o*-Phthaldialdehyd und Fluorescamin reagieren nur mit primären Aminen. Mit Ausnahme der Arbeit von Imai (8), werden die angegebenen Verfahren zudem nicht auf physiologische Flüssigkeiten angewandt.

Die gaschromatographische Bestimmung der Pentafluorpropionyl-Derivate der Amine erwies sich in unserem Labor als höchst problematisch: Entweder erreichten wir mit gepackten Säulen keine ausreichende Trennung oder die Derivate zersetzten sich in der Glaskapillare.

Demgegenüber ist die Technik der automatisierten Aminosäurechromatographie seit Jahren ausgereift. In der von uns hier vorgelegten Methode wird die quantitative Analyse der Summe aus freiem und konjugiertem Noradrenalin, Dopamin und Normetanephrin aus dem Urin mit einem Aminosäureanalysator beschrieben. Einen ähnlichen Weg sind Wall (9); Cronin (10) und Villanueva (11) bei der Bestimmung einiger Amine aus pflanzlichen Extrakten, extraterrestischem Material und Standardlösungen gegangen.

Methodik

Der Analysator setzte sich aus folgenden Bausteinen zusammen:

Programmereinheit BT 5052 (Biotronik)
 2 Dosapro-Pumpen 19633 (Milton-Roy)
 Ultrathermostat K 5 (Colora)
 Schreiber PM 8000 (Philips)
 Fluorimeter BT 6630 (Biotronik)
 Austauschersäule 6 mm i.D. (Biotronik)
 Austauschharz DC 6 A (Durrum)
 Integrator Autolab System I (Spectra-Physics)

Zur Pulsationsdämpfung wurde zwischen dem Rückschlagventil der Reagenzpumpe und Mischblock ein Teflonschlauch (30 m × 0,3 mm)

eingesetzt.

Elutionspuffer

21,0 g/l Lithiumchlorid (Merck, Nr. 5679) und 31,5 g/l Lithiumcitrat (Merck, Nr. 5683); der pH-Wert von 3,95 wurde mit Lithiumhydroxid (Merck, Nr. 5691) und Salzsäure (Merck, Nr. 319) eingestellt.

Probenverdünnungspuffer

14,0 g/l Lithiumcitrat; pH = 3,50.

Reaktionslösung

1 l einer Borsäurelösung (81,63 g/l, Merck, Nr. 765) wird mit KOH (35 g/l) auf pH = 10,30 gebracht. Dazu gibt man tropfenweise 3 ml Mercaptoethanol (Merck, Nr. 805740) und 10 ml einer ethanolschen *o*-Phthaldialdehydlösung (50 g/l, Merck, Nr. 11452). Anschließend wird die Lösung durch Anlegen eines Wasserstrahlvakuum gründlich entlüftet und danach 2 ml einer Brij-35-Lösung (300 g/l; Fluka 16005) zugegeben. Die Reaktionsfähigkeit dieser Lösung bleibt etwa eine Woche erhalten. (Mercaptoethanol sollte bei 4 °C unter Stickstoff aufbewahrt werden).

Elutionsbedingungen

Puffer- und Reagenzdurchfluß: 52 ml/h
 Säulentemperatur: 65 °C
 Füllhöhe: 85–90 mm
 Reaktionscoil: Länge 15 m, 0,3 mm i. D.; die Reaktion erfolgt bei Raumtemperatur.

Probenvorbereitung

20 ml Urin werden mit konzentrierter Salzsäure auf pH 0,75 gebracht und zentrifugiert. 5 ml des Überstandes werden im Wasserbad bei 100 °C während 20 min hydrolysiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 14 ml einer Di-Natrium-ethylen-di-nitrolo-tetraessigsäure-dihydrat (EDTA-, Titriplex -III-)Lösung hinzugegeben (3,36 g/l) und mit NaOH (300 g/l) auf pH 6,50 gebracht. Diese Lösung wird auf eine Bio-Rad Fertigsäule gegeben. (Diese Säulen – schwach saure Kationenaustauscher in Na-Form – sind Bestandteile des Catecholamin-Kits der Firma Bio-Rad, München). Nach Waschen der Säule mit 22,5 ml H₂O werden Noradrenalin und Dopamin mit 75 ml 0,5 mol/l H₃BO₃ eluiert. Das Eluat wird am Rotationsverdampfer bei 35 °C bis zur Trockene eingedampft und in 3 ml des Probenverdünnungspuffers aufgenommen. 0,4 ml dieser Lösung und 0,02 ml der Normetanephrinstandardlösung (0,019 g/l) werden injiziert.

Die gleiche Säule wird dann mit 7,5 ml H₂O gewaschen und Normetanephrin mit 7,5 ml NH₄OH (4 mol/l) eluiert. Das Eluat wird bei pH = 11,0 dreimal während 3 min mit je 40 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden am Rotationsverdampfer bei 35 °C zur Trockene eingedampft. Nach Aufnahme des Rückstandes in 1 ml Probenverdünnungspuffer werden 0,4 ml der erhaltenen Lösung injiziert.

Ergebnisse

Abbildung 1 zeigt das Elutionsdiagramm einer Standardprobe, die 302 ng Noradrenalin, 364 ng Normetanephrin und 606 ng Dopamin enthält. In Abbildung 2 und Abbildung 3 sind die Chromatogramme des Borsäure- bzw. des Ammoniumhydroxideluats eines Normalharns dargestellt. In Tabelle 1 sind die Qualitätskriterien der beschriebenen Methode angegeben.

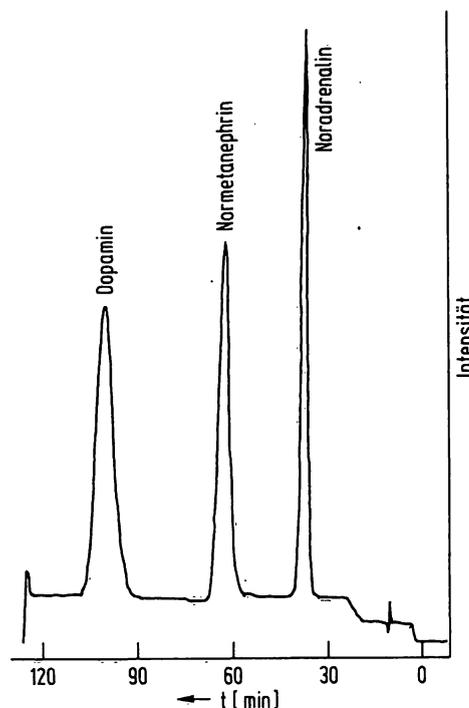


Abb. 1. Chromatogramm einer Standardlösung; Bedingungen siehe Text, Detektor Stufe 10.

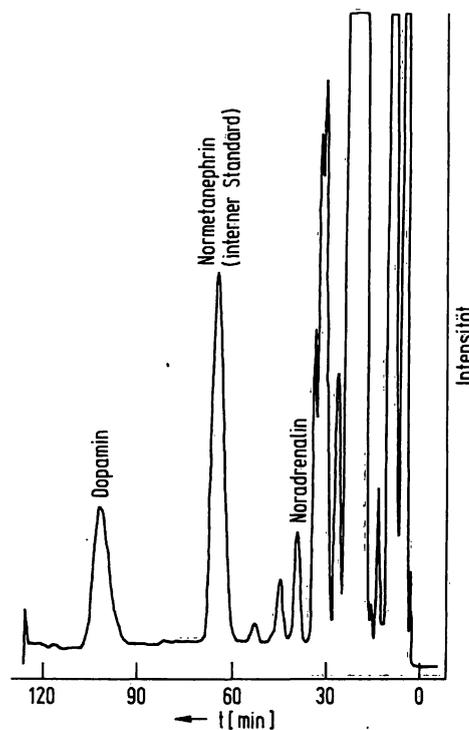


Abb. 2. Chromatogramm des Borsäureeluats der Bio Rad-Fertigsäule mit Dopamin und Noradrenalin; (Normalharn ohne Zusatz von Standardsubstanzen.) Bedingungen siehe Text; Detektor – Stufe 10.

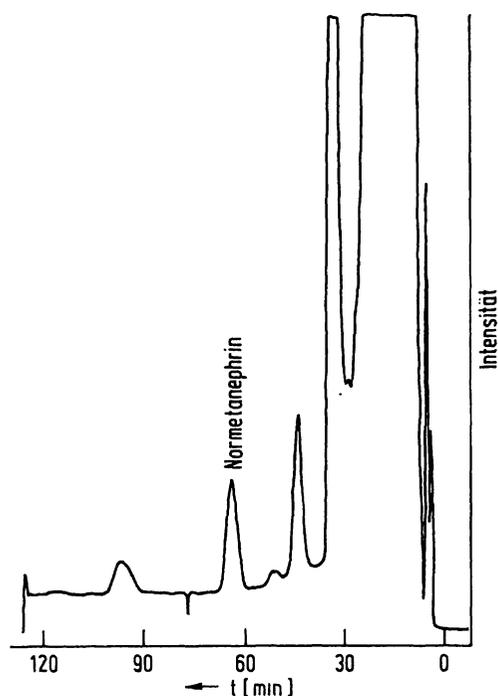


Abb. 3. Chromatogramm des Ammoniumhydroxideluats der Bio Rad-Fertigsäule mit Normetanephrin; (Normalharn ohne Zusatz von Standardsubstanzen.) Bedingungen siehe Text; Detektor – Stufe 10.

Tab. 1. Qualitätskriterien der Bestimmung von Noradrenalin, Dopamin und Normetanephrin. Die angegebenen Werte wurden für den gesamten Analysengang ermittelt.

Substanz	überprüfter Linearitätsbereich ng/l	Richtigkeit (%) n = 10	Präzision VK (%)	Nachweisgrenze (ng)
Normetanephrin	50 – 750	53,4	2,6	4
Noradrenalin	37,5 – 375	67,8	2,8	1
Dopamin	250 – 2500	83,3	5,3	15

Richtigkeit und Präzision wurden für den gesamten Analysengang ermittelt, d. h. der durch die Säurehydrolyse bedingte Fehler wurde berücksichtigt.

Zur Ermittlung der Präzision in der Serie wurde eine Urinprobe 10mal aufgearbeitet. Die hierbei erhaltenen Variationskoeffizienten sind in Tabelle 1 angegeben. Anschließend wurde zu je 5 ml der gleichen Urinprobe zwischen 500 ng und 1358 ng Normetanephrin, 790 ng und 1400 ng Noradrenalin bzw. 1300 ng und 2600 ng Dopamin zugesetzt. Mit Hilfe unserer Standardkurve ermittelten wir die diesen zugeführten Substanzmengen entsprechenden Flächenausbeuten. In unserer Bestimmung der Richtigkeit wurden diese Werte gleich 100% gesetzt. Die Differenz aus Normalurinkonzentrationen plus zugesetztem Standard und Normalurinkonzentration ohne Zusatz ergab dann den in Tabelle 1 angege-

benen Wert für die Richtigkeit. Letztere blieb für alle getesteten Konzentrationen gleich. Die Nachweisgrenze entspricht dem doppelten Wert des Grundrauschens unter den angeführten Analysenbedingungen.

Auffallen mag, daß bei Standardlösungen Noradrenalin, Dopamin und Normetanephrin in einem Chromatogramm bestimmt werden, während in Urinproben Normetanephrin getrennt analysiert wird. Dieses Vorgehen erschien uns günstiger, da die Noradrenalin und Dopamin enthaltende Urinfraktion soviel Borsäure enthält, daß 3 ml Probenverdünnungspuffer zum Lösen nötig sind. Die Normetanephrin enthaltende Urinfraktion kann jedoch bequem in 1 ml Probenverdünnungspuffer aufgenommen werden, wodurch eine günstigere Nachweisgrenze erzielt wird. Darüber hinaus ist es jetzt möglich, jeder zweiten Analyse Normetanephrin als externen Standard zuzusetzen, und so das Nachlassen der Reaktionsbereitschaft der Reagenzlösung auszugleichen.

Im Gegensatz zu den Angaben von *da Prada* (12) erreichen wir für Normetanephrin mit Essigsäureethylester eine bessere Extraktionsausbeute im Vergleich zur Extraktion mit Diethylether unter Zusatz von Natriumtetraphenylborat.

Tabelle 2 gibt die Mittelwerte der im 24 h-Urin von 9 Kontrollpersonen gefundenen Konzentrationen an Noradrenalin, Dopamin und Normetanephrin wieder.

Die erhaltenen Werte für Noradrenalin und Normetanephrin stimmen mit den in der Literatur angegebenen Konzentrationen überein (13–16). Die gemessene Dopaminkonzentration beträgt jedoch ungefähr das sechsfache mancher Literaturangaben. Dies mag darauf zurückzuführen sein, daß die Ausscheidung von Dopamin stark von der Ernährung abhängt.

Die weite Verbreitung von automatischen Aminosäureanalysatoren in klinisch-chemischen Labors erschließt der beschriebenen Methode eine breite Anwendung. Die Umrüstung eines Standard-Aminosäureanalysators auf die *o*-Phthaldialdehyd-Reaktion, auch zur Bestimmung der Aminosäuren, bietet einige Vorteile: Bei gesteigerter Nachweisempfindlichkeit wird eine ruhigere Basislinie und ein größerer Linearitätsbereich erzielt, die Reagenzlösung benötigt weniger Schutzvorkehrungen zum Erhalt ihrer Reaktionsfähigkeit und sie ist um ungefähr 50% billiger als eine Ninhydrinlösung.

Tab. 2. Mittelwert der Konzentration an Noradrenalin, Dopamin und Normetanephrin im Urin von 9 Kontrollpersonen.

Substanz	$\bar{x} \pm s$ ($\mu\text{g}/24 \text{ h}$)	Bereich ($\mu\text{g}/24 \text{ h}$)
Noradrenalin	165,2 \pm 60,9	110,2 – 315,27
Dopamin	1473,5 \pm 678,5	760,9 – 2856,9
Normetanephrin	270,9 \pm 37,5	219,5 – 326,9

Literatur

1. Robertson, D., Heath, E. C., Falkner, F. C., Rayburn, E. H., Brilis, G. M. & Watson, J. T. (1978), *Biomed Mass Spectrometry* 5, 704-708.
2. Ehrhardt, J. D. & Schwartz, J. (1978), *Clin. Chim. Acta* 88, 71-79.
3. Engelmann, K., Portnay, B. & Lovenberg, W. (1968), *Am. J. Med. Sci.* 255, 259-268.
4. Schwedt, G. (1977), *Anal. Chim. Acta* 92, 337-344.
5. Schwedt, G. (1976), *J. Chromatogr.* 118, 429-432.
6. Schwedt, G. & Bussemas, H. H. (1978), *Z. Anal. Chem.* 283, 23-28.
7. Schwedt, G. (1977), *J. Chromatogr.* 143, 463-471.
8. Imai, K. & Tamura, Z. (1978), *Clin. Chim. Acta* 85, 1-6.
9. Wall, R. A. (1971), *J. Chromatogr.* 60, 195-202.
10. Cronin, J. R. & Hare, P. E. (1976), *Anal. Biochem.* 81, 151-156.
11. Villanueva, V. R., Adlakha, R. C. & Cantera-Soler, A. M. (1977), *J. Chromatogr.* 139, 381-385.
12. Da Prada, M. & Zürcher, G. (1976), *Life Science* 19, 1161-1174.
13. Nelson, L. M., Bubb, F. A., Lax, P. M. & Sandler, M. (1979), *Clin. Chim. Acta* 92, 235-240.
14. Robertson, D., Fröhlich, J. C., Carr, R. K., Watson, J. T., Hollifield, J. W., Shand, D. G. & Cates, J. A. (1978), *N. Engl. J. Med.* 298, 181.
15. Takahashi, S., Leiv, R. & Gjessing, D. (1972), *Clin. Chim. Acta* 36, 369-378.
16. Winkel, P. & Slob, A. (1973), *Clin. Chim. Acta* 45, 113-118.

Dr. Klaus Olek
Institut für Humangenetik
der Universität Bonn
Wilhelmstraße 31
D-5300 Bonn