

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 364—367, Juli 1970

Ein Gerät zur automatischen Urinextraktion mit anschließend kontinuierlicher Bestimmung von 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure und von 17-Oxosteroiden

VON H. PRATZEL

*Aus dem Institut für Medizinische Balneologie und Klimatologie der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. J. Lissner)*

Unter technischer Mitarbeit¹⁾ von G. Kapustova und W. Obwexer

(Eingegangen am 4. März 1970)

Es wird ein automatischer Extraktionsapparat zur relativen klinischen Analyse beschrieben, der in 24 Stdn. etwa 200 Urinproben bearbeitet.

Die mit β -Glucuronidase vorbehandelten Urinproben (etwa 10 ml) werden mit einem speziellen Probennehmer aus Reagenzgläsern entnommen, mit Chloroform im Automaten extrahiert, daraus mit 0,2 N NaOH die 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure ausgeschüttelt und dem 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure-Analysator zugeführt. Die gewonnene Chloroformlösung wird kontinuierlich verdampft, das Lösungsmittel wieder verwendet, der Rückstand in einer wäßrigen Reagenzlösung aufgenommen und dem 17-Oxosteroid-Analysator zugeführt.

Zur 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure-Bestimmung wurde das Verfahren von WORWOD und KNIGHT (5) automatisiert. Die 17-Oxosteroid-Bestimmung erfolgte in Anlehnung an das automatische Verfahren von CHILD und CAISEY (2).

An apparatus for the automatic extraction of urine coupled with the determination of 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid and 17-oxosteroids

An automatic extraction apparatus for relative clinical analysis, which can process about 200 urine samples in 24 hr, is described.

The urine samples (about 10 ml), pretreated with β -glucuronidase, are removed with a special sampler made from test tubes and then extracted automatically with chloroform. The 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid is extracted from the chloroform with 0.2 N NaOH and then introduced into the 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid-analyser. The chloroform is then continually distilled and used again; the residue from this is dissolved in an aqueous reagent solution and led into the 17-oxosteroid analyser.

The method of WORWOD and KNIGHT (5) was automated for the 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid-determination. The 17-oxosteroid determination was based on the automatic method of CHILD and CAISEY (2).

Besonders bei der Urin-Analyse findet man häufig analytische Verfahren, die eine Anreicherung der zu untersuchenden Substanz durch extraktives Ausschüteln vorsehen. Diese Arbeit ist im klinischen Labor unbeliebt und vor allem äußerst zeitraubend, so daß hier ein allgemeines Bedürfnis zur Automation besteht.

Wir standen vor der Aufgabe, zu Studienzwecken über die Wirkung von verschiedenen Klimafaktoren auf den Menschen in einigen tausend Urinproben Relativwerte für den Gehalt an 17-Oxosteroiden und 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure zu finden. Die 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure entsteht beim Abbau der Katecholamine. Die im Urin ausgeschiedene Menge gilt als Informationsgröße über die Tätigkeit des Nebennierenmarks. Über die automatische Bestimmung der 17-Oxosteroiden ist schon mehrmals berichtet worden (1, 2, 3). Wir richteten uns weitgehend nach den Angaben von LAUE (3) und CHILD und CAISEY (2). Allerdings kam es uns darauf an, auch den Extraktionsvorgang in den automatischen Ablauf einzubeziehen, zumal auch für die Bestimmung der 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure eine Extraktion nötig wurde. Die 17-Oxosteroide und die 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure sind beide mit

Hilfe von Chloroform aus stark saurem Urin extrahierbar. Ein nachgeschalteter Waschprozeß mit 0,2 N Natronlauge ist zur Beseitigung von Verunreinigungen aus der Chloroformphase notwendig, da sonst die 17-Oxosteroid-Bestimmung gestört wird. In die Natronlauge geht zugleich die 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure aufgrund ihrer Säurenatur über, wodurch ein einfacher Trennungsgang für beide Substanzen möglich ist.

1964 hat AUBERT (4) über eine Anordnung zur automatischen Extraktion der 17-Oxosteroide berichtet. Dieses Prinzip haben wir zur Ausführung von Simultanbestimmungen technisch weiterentwickelt.

Vorbereitung der Urinproben

Die Urinproben wurden zunächst in gefrorenem Zustand gelagert, wozu uns besonders gut geeignete Plastikgefäße von der Firma Böhlinger dankenswerterweise zur Verfügung gestellt wurden. Unmittelbar vor der Verarbeitung wurde eine bestimmte Anzahl von Urinproben im Trockenschrank schnell aufgetaut. Mit einem Autotitrator (Fa. Hillerkus) wurde durch Zugabe von Eisessig ein pH-Wert von 4,6 in den Urinproben eingestellt und mit einem Abfüllautomaten (Stuttgarter automatisches Analysensystem (8)) jeweils 10 ml der Urinproben, sowie 2500 Fishman-Einheiten β -Glucuronidase (Präparat aus Weinbergschnecken mit Steroidsulfatase Fa. Serva) und 2 ml Acetatpuffer pH 4,62 in Reagenzgläser gegeben. Die Glucuronide wurden bei 37° 24 Stdn. im Brutschrank gespalten (Abb. 1).

¹⁾ Herstellung und Erprobung der Geräte.

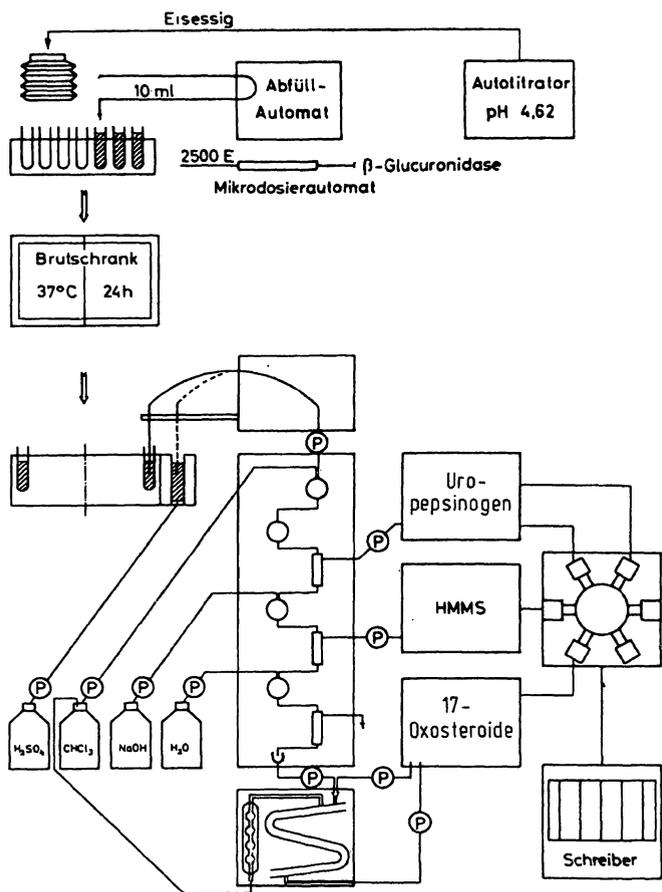


Abb. 1

Schematische Darstellung des gesamten Arbeitsablaufs
HMMS = 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure

In dem Enzympräparat sind nur etwa 0,1 EU Steroidsulfatase enthalten, so daß die Schwefelsäureester nur zu einem geringen Teil gespalten wurden, was für unsere Fragestellung jedoch zulässig war. Durch geeignete Vorbereitungen lassen sich jedoch auch andere Fraktionen der 17-Oxosteroide bestimmen.

Zur Probeneinschleusung in den sich nun anschließenden automatisch ablaufenden Arbeitsgang haben wir einen neuen Probenehmer mit größerer Eintauchtiefe für Reagenzgläser entwickelt. Die Urinprobe wird mittels einer Schlauchpumpe in den Extraktionsapparat befördert. Dazu verweilt die Nadel des Entnehmers 5 Min. im Reagenzglas und anschließend 2. Min. in der Spülflüssigkeit, die aus 50proz. Schwefelsäure, gesättigt mit Ammoniumsulfat, besteht. Dadurch wird im ersten Extraktionskölbchen ein stark saures Milieu zur weitgehenden Extraktion der 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure geschaffen.

Extraktionsapparat

Zum Extraktionsapparat gehören drei Typen von Glasgefäßen, die mit Magnetventilen zu öffnen sind. Es handelt sich um 4 Extraktionskölbchen mit Magnetrührern, 3 Phasentrennern und 3 Dosiergefäßen für die Extraktionsmittel, welche die gleiche Form haben wie die Phasentrenner (Abb. 2).

Eine Schlauchpumpe (P) fördert die Urinprobe, das Extraktionsmittel Chloroform (Acidflexschlauch), 0,2N NaOH und Wasser in die vorgesehenen Glasgefäße, die sich in verschiedenen Etagen befinden. Ein Programmgeber steuert die Öffnungs- und Schließzeiten der Magnetventile und den Probenehmer, so daß ein Arbeitszyklus entsteht.

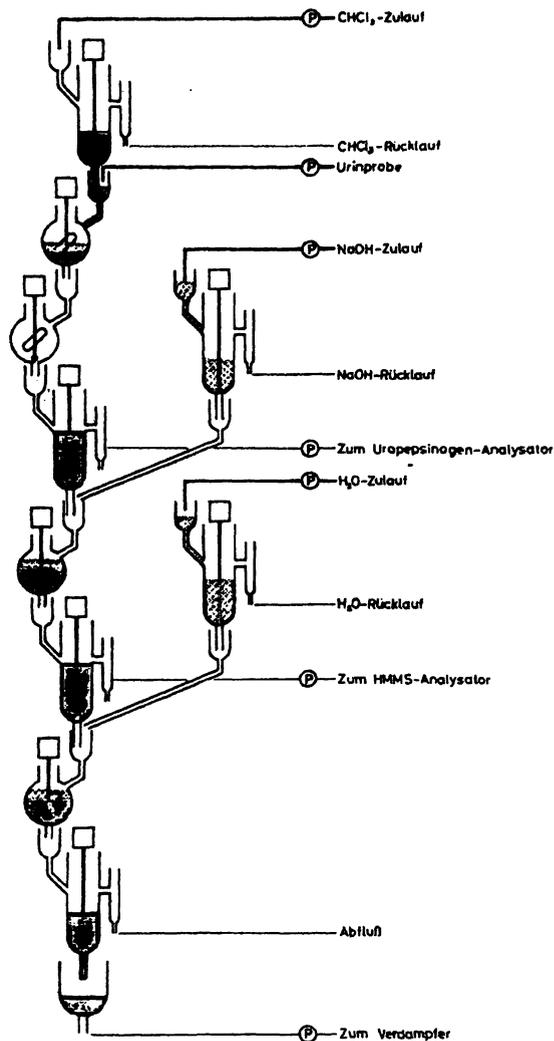


Abb. 2

Schematische Darstellung des Extraktionsapparates

Das oberste Extraktionskölbchen schließt sich, während über die Probenzuführung Spülflüssigkeit einfließt. Anschließend folgt 5 Min. lang Urin und dann wieder Spülflüssigkeit. Eine Minute nachdem sich dieses Kölbchen geschlossen hat, entleert sich das Dosiergefäß für die Chloroformmenge (25 ml) in dieses erste Extraktionskölbchen. Nach 7 Min. wird die Urinprobe zusammen mit dem Chloroform in das zweite Extraktionskölbchen gegeben. Das geschieht zu dem Zeitpunkt, an dem bereits wieder Spülflüssigkeit zuläuft, wodurch eine Vermischung der einzelnen Proben ausgeschlossen ist.

Das zweite Extraktionskölbchen öffnet sich nach weiteren 7 Min., wodurch dessen Inhalt in den Phasentrenner fließt. Die leichtere Urinprobe wird mit einer kleinen Chloroformmenge über den seitlichen Ausgang abgeleitet, während die schwere Chloroformphase allein zurückbleibt. Nach weiteren 7 Min. wird die Chloroformphase in ein weiteres Extraktionskölbchen überführt, in welches sich gleichzeitig das Natronlagedosiergefäß (10 ml) entleert. Die 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure tritt in die Lauge über, nach 7 Min. entleert sich der Inhalt dieses dritten Extraktionskölbchens in den zweiten Phasentrenner. Die leichtere Laugenphase fließt über den seitlichen Ausgang in einen Trichter, der von der Schlauchpumpe des 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure-Analysators in 7 Min. geleert wird.

Die Chloroformphase wird nach 7 Min. in das vierte Extraktionskölbchen abgelassen und gleichzeitig entleert sich das Wasserdosiergefäß (10 ml). Es werden Reste der Natronlauge ausgewa-

schen und nach 7 Min. im dritten Phasentrenner entfernt. Die ausgewaschene Chloroformphase wird im untersten Trichter aufgefangen und in etwa 5 Min. mit der Schlauchpumpe des Extraktionsapparates (Acidflexschlauch) in einen Verdampfer überführt, der zur Chloroformrückgewinnung dient.

Der Extraktionsvorgang findet in 7 Glasgefäßen statt, die in einem Rhythmus von 7 Min. nacheinander geöffnet werden. Da zu jedem Zeitpunkt nur 6 dieser Gefäße gefüllt sind und in einem Zeitabstand von einer Minute vom unteren zum oberen fortschreitend nacheinander entleert wird, können sich die verschiedenen Proben nicht treffen und ein zyklischer Arbeitsablauf ist ermöglicht.

Eine Emulsionsbildung zwischen Urin und Chloroform haben wir bei nicht zu hohen Drehzahlen der Magnetrührer (etwa 400 U./Min.) nicht beobachtet. Die drei Dosiergefäße werden über die Schlauchpumpe laufend schnell aufgefüllt, der Überlauf ist mit den Vorratsflaschen verbunden.

Der Verdampfer

Zur Bestimmung der 17-Oxosteroide muß das Chloroform abgedampft werden. Wir haben in Anlehnung an die Experimente von CHILD und CAISEY, welche Dichlormethan in einem wassergeheizten Verdampfungsröhr vor dem 17-Oxosteroid-Analysator entfernten, einen Verdampfer für Chloroform entwickelt (Abb. 3).

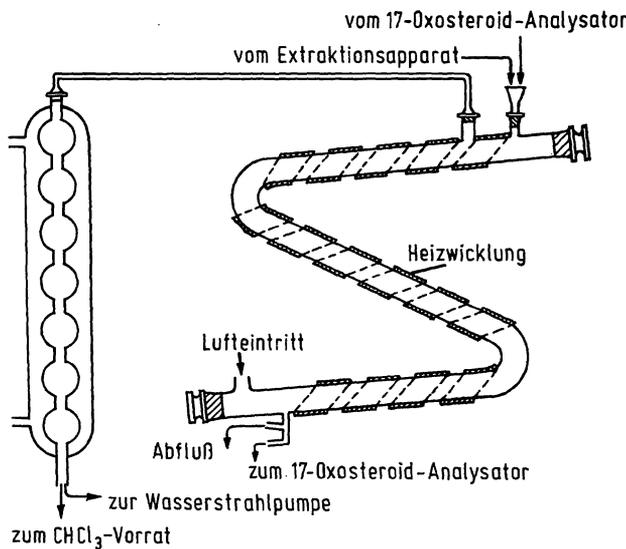


Abb. 3
Schematische Darstellung des Verdampfers

Die Chloroform-Lösung wird in ein etwa 90 cm langes, etwas geneigtes Röhr geleitet, welches von außen auf etwa 120° elektrisch geheizt wird. Entgegen dem herunterfließenden Chloroform wird mit einer Wasserstrahlpumpe ein Luftstrom gesaugt, der die Chloroformdämpfe in einen Kühler überführt. Das zurückgewonnene Chloroform fließt von dort in die Vorratsflasche zurück. Gleichzeitig wird in den oberen Trichter eine wäßrige Hyamin/*m*-Dinitrobenzol-Lösung aus dem 17-Oxosteroid-Analysator eingeleitet. Diese verdampft nur wenig und löst die 17-Oxosteroide aus dem Chloroform auf. Am unteren Ausgang des Verdampfers wird diese Lösung vom 17-Oxosteroid-Analysator aufgenommen (Abb. 4).

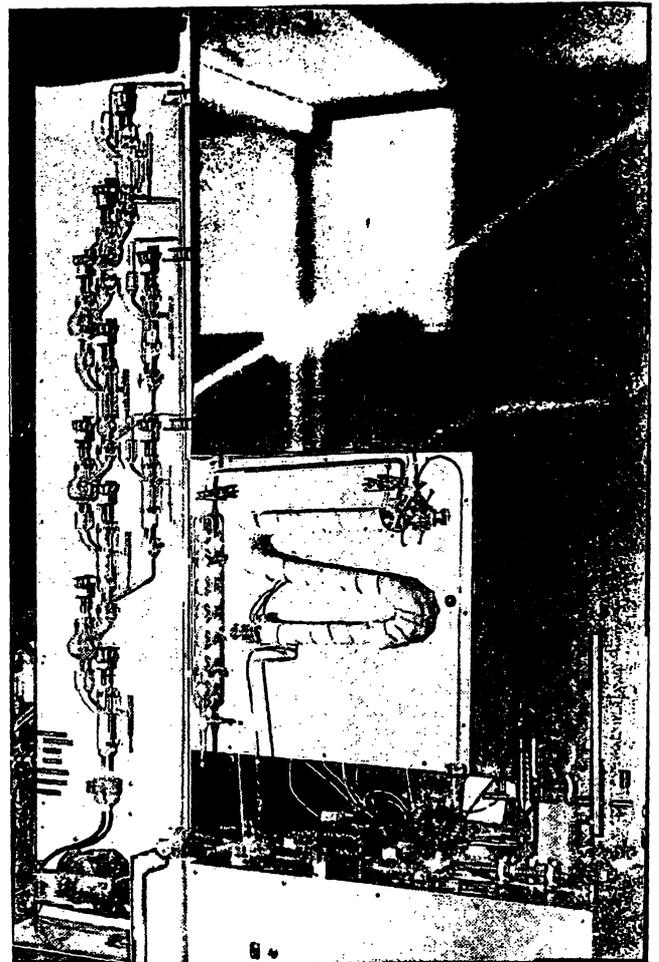


Abb. 4
Gesamtansicht des Extraktionsapparates zusammen mit dem 17-Oxosteroid-Analysator

Da die Chloroformlösung einer Probe aus dem Extraktionsapparat in etwa 5 Min. zum Verdampfen gebracht wird, während die Probenfrequenz 7 Min. beträgt, läuft die Hyaminlösung 2 Min. lang ohne Chloroform durch den Verdampfer. Dadurch wird auf dem Registrierstreifen die Basislinie erreicht.

Der 17-Oxosteroid-Analysator wurde entsprechend der Anordnung von LAUE (3) aufgebaut. Es ist lediglich eine Anpassung an unsere Analysenfrequenz von 7 Min. pro Probe vorgenommen worden (Abb. 5).

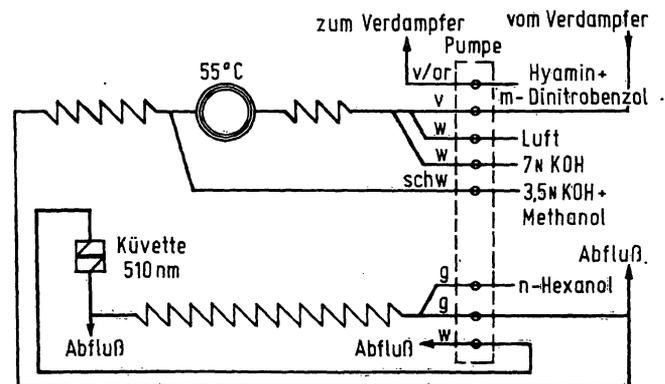


Abb. 5
Fließdiagramm des 17-Oxosteroid-Analysators

Der 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure-Analysator

Zur Bestimmung der 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure haben wir ein Verfahren von WORWOD und KNIGHT (5, 6, 7) automatisiert. Bei dieser Reaktion wird die 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure aufgrund ihrer Phenolnatur mit diazotiertem 4-Nitranilin gekuppelt. Der Farbstoff wird nach dem Alkalisieren in Chloroform aufgenommen, anschließend in Natronlauge überführt und bei 510 nm gemessen. Dazu dient folgendes Schlauchsystem (Abb. 6):

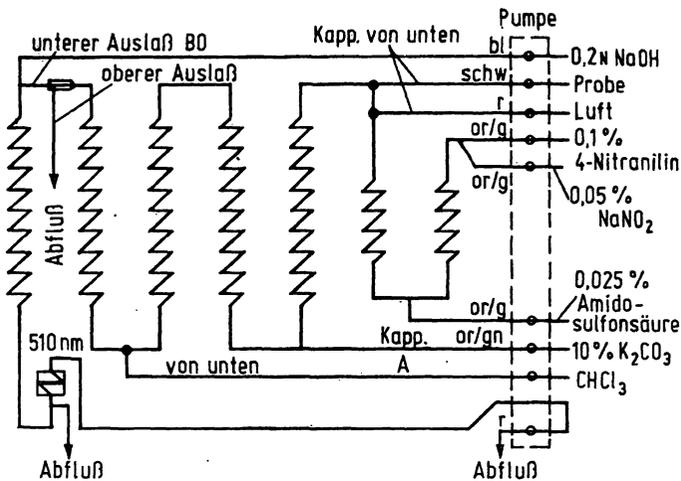


Abb. 6

Fließdiagramm des 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure-Analysators

Eine 0,1proz. Lösung von 4-Nitranilin wird mit 0,05proz. Natriumnitritlösung in einem kurzen Mixer (1,5 ml) diazotiert. Durch Zugabe von 0,05proz. Amidosulfonsäure wird das überschüssige Nitrit in einem weiteren kurzen Mixer (1,5 ml) zerstört. Diese Lösung wird nun mit Luft segmentiert und mit der Probe aus dem Extraktionsapparat vereinigt. Nach Passieren eines langen Mixers (5 ml) wird mit 10proz. K_2CO_3 -Lösung alkalisiert und nach Passieren von zwei langen Mixern (2×5 ml) entsteht das Farbmaximum. Der Farbstoff wird nun mit Chloroform in einem langen Mixer (5 ml) extrahiert. Um eine gleichmäßige Segmentierung der wäßrigen Phase zu erreichen ist es wichtig, das Chloroform von unten in das waagerechte Rohr einzuleiten. In einem BO-Fitting (Technicon) mit kapillarem Auslass wird die wäßrige Phase zusammen mit der Luft abgeschieden, die Chloroform-Lösung anschließend mit 0,2 N Natronlauge segmentiert und der Farbstoff in einem langen Mixer (5 ml) in die Laugenphase überführt. Die Probenfrequenz ist durch den Extraktionsvorgang vorgegeben und beträgt 7 Min. Um eine Anpassung der Pumpengeschwindigkeit an den Extraktionsapparat zu erreichen, verwendeten wir eine kontinuierlich verstellbare Schlauchpumpe (Modell Desaga).

Zur Eichung des Verfahrens wurden Standard-Lösungen im Konzentrationsbereich von 0,025 bis 0,125 mg DL-4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure/ml an-

statt des Urins verwendet, die gleichfalls Dehydroepiandrosteron ($10-50 \mu\text{g/ml}$) zur Eichung der 17-Oxosteroid-Analyse enthielten.

Die Spezifität der 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure, vor allem bei Zufuhr bestimmter Nahrungsmittel und Pharmaka, müßte noch überprüft werden.

Kolorimeter

Zur Messung der 17-Oxosteroid und 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure verwendeten wir ein Mikro-Durchfluß-Kolorimeter (Fa. Labotron), welches mit maximal 6 Meßstellen besetzt werden kann und einen 6fach Punktdrucker. Zur Bestimmung der 17-Oxosteroide wurde eine 10 mm PVC-Küvette mit 1 mm Bohrung verwendet, für die 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure eine 5 mm Glas-Küvette mit einer 2 mm Bohrung.

Reagenzien und Pumpengeschwindigkeiten

Zum Extraktionsapparat:

Chloroform (3,5 ml/Min.)
0,2 N NaOH (1,4 ml/Min.)
Wasser (1,4 ml/Min.)
Probe (1,4 ml/Min.)

Zum 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure-Analysator:

Probe (1,4 ml/Min.)
Luft (0,64 ml/Min.)
4-Nitranilinlösung (0,32 ml/Min.)
0,5 g 4-Nitranilin in
3 ml konz. HCl auflösen und mit Wasser auf
500 ml verdünnen, filtrieren.
0,05proz. Natriumnitritlösung (0,32 ml/Min.)
0,025proz. Amidosulfonsäurelösung (0,32 ml/Min.)
10proz. K_2CO_3 -Lösung (0,2 ml/Min.)
Chloroform (1,4 ml/Min.)

Zum Verdampfer:

Probe (3,0 ml/Min.)
Hyamin-Lösung (2,9 ml/Min.)
50 ml Hyamin 2389 (Serva) auf
5 l mit Wasser verdünnen,
3,75 g *m*-Dinitrobenzol zugeben. Im Dunkeln rühren, bis es
gelöst ist, dann filtrieren.

Zum 17-Oxosteroid-Analysator:

Probe I (0,7 ml/Min.)
Luft (0,56 ml/Min.)
3,5 N KOH (0,32 ml/Min.)
1000 ml 7 N KOH werden mit
1000 ml Methanol verdünnt.
7 N KOH (0,56 ml/Min.)
Probe II (1,06 ml/Min.)
n-Hexanol (1,06 ml/Min.)

Literatur

1. ZAK, B. und E. EPSTEIN, *Chemist-Analyst* 52, 45 (1963). — 2. CHILD, K. J. und J. D. CAISEY, An automated method for the determination of urinary 17-hydroxycorticosteroids, *Techn. Symp. Paris* (1966). — 3. LAUE, D., Die Bestimmung der 17-Hydroxycorticosteroide und der 17-Ketosteroide mit dem Autoanalyser Technicon, *Techn. Symp. Brighton* (1967). — 4. AUBERT, J., Ex-

traction et dosage automatique des 17-Cetosteroides, *Techn. Symp. Paris* (1964). — 5. WORWOD, A. J. und R. KNIGHT, *J. Clin. Path., London* 14, 502 (1961). — 6. GEORGES, R. J. und N. A. SMALL, *ibid.* 15, 788 (1962). — 7. KAKAC, B. und Z. J. VEJDELEK, *Handbuch der Kolorimetrie*. — 8. KELLER, H. und H. SCHEURENBRAND, *Z. analyt. Chem.*, 243, 705 (1968).

Dr. rer. nat. Helmut Pratzel,
Institut für Medizinische Balneologie und Klimatologie
der Universität München,
München 55, Marchioninstraße 17