

Ich danke Herrn Prof. *Büchi* für viele gute Ratschläge und Herrn *Payot* (Bern) für die graphische Darstellung der Kurven.

SUMMARY.

The structure VI of *Flavaspid acid* and VII for *Aspidin* were determined on the grounds of UV. absorption spectra.

Pharmazeutisches Institut
der Eidg. Technischen Hochschule in Zürich
und Forschungsinstitut der *Dr. A. Wander AG.* in Bern.

18. Über die Bestimmung der Catecholamine und der Brenzcatechine im menschlichen Harn

von M. Goldstein und I. Abelin.

(12. XII. 55.)

In den letzten Jahrzehnten erlangte die Bestimmung der Hormone im Harn einen grossen wissenschaftlichen und praktischen Wert. Für die Bestimmung der Prolane A und B, der Sexualhormone, der Hormone der Nebennierenrinde liegen geeignete Verfahren vor. Am wenigsten befriedigend waren bis zuletzt die Analysen der Schilddrüsenhormone und des Nebennierenmarkes. Die an sich verwickelten und unsicheren Methoden der Thyroxinbestimmung im Harn haben durch die Auffindung der Di- und Trijodthyronine an Beweiskraft eingebüsst.

Als Vertreter der Hormone des Nebennierenmarkes gelten Adrenalin, Noradrenalin, Hydroxytyramin. Mit dem Vorkommen weiterer Catecholamine (Tyramin?) darf gerechnet werden; sie dürften allerdings in sehr geringen Mengen vorhanden sein. Die Bestimmung dieser Produkte erfolgte früher ausschliesslich auf biologischem Wege, z. B. durch Messung der Blutdruckerhöhung an der Katze oder durch Be-

einflussung der glatten Muskulatur des Darmes. Die Einführung zuverlässiger chemischer Methoden wurde erst durch die chromatographische Technik und die Verfeinerung der Fluorimetrie ermöglicht. Neben älteren Methoden von *Whitehorn*¹⁾, *Show*²⁾, *Raab*³⁾, *Holtz* und Mitarbeiter⁴⁾ liegen Verbesserungen von *U. S. v. Euler*⁵⁾, *Weil-Malherbe*⁶⁾, *Lund*⁷⁾ vor.

Die Catecholamine des Harnes werden von Brenzcatechinen begleitet. Wie Tab. 1 und 3 zeigen, überwiegt die Menge der Gesamtbrenzcatechine diejenige der Catecholamine. Es ergab sich die Notwendigkeit einer Trennung der beiden Gruppen sowie einer Aufteilung der Catecholamine in die 3 wichtigsten Fraktionen, Adrenalin, Noradrenalin und Hydroxytyramin. Unter Heranziehung fremder und eigener Erfahrungen konnten zuletzt brauchbare Verfahren ausgearbeitet werden.

I. Quantitative Bestimmung der Catecholamine im Harn.

A) Bestimmung der freien und gebundenen Catecholamine. Die Catecholamine können erst nach Extraktion und Befreiung von fremden Begleitstoffen quantitativ bestimmt werden. Als Extraktionsmittel bewährte sich das Butanol, welches aber die Catecholamine bei neutraler Reaktion nur unvollständig extrahiert. Die Verwendung alkalischer Lösungen verbietet sich wegen der hohen Empfindlichkeit aller Brenzcatechinderivate gegenüber einem pH oberhalb von 7,0. Am besten bewährte sich die Extraktion

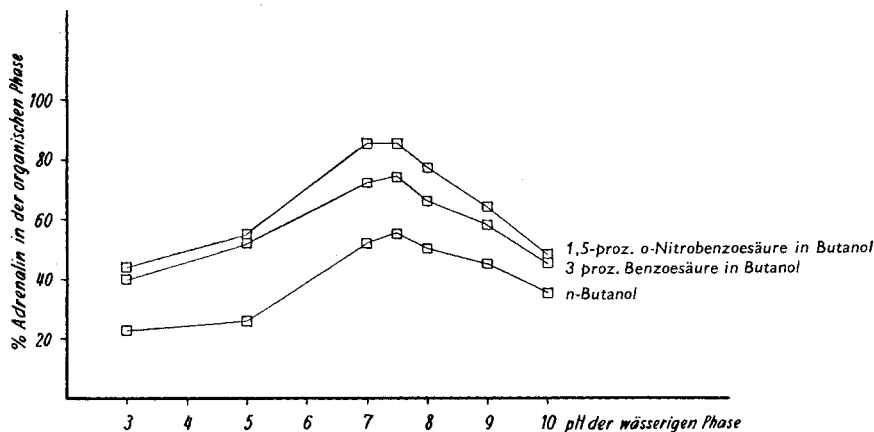


Fig. 1.

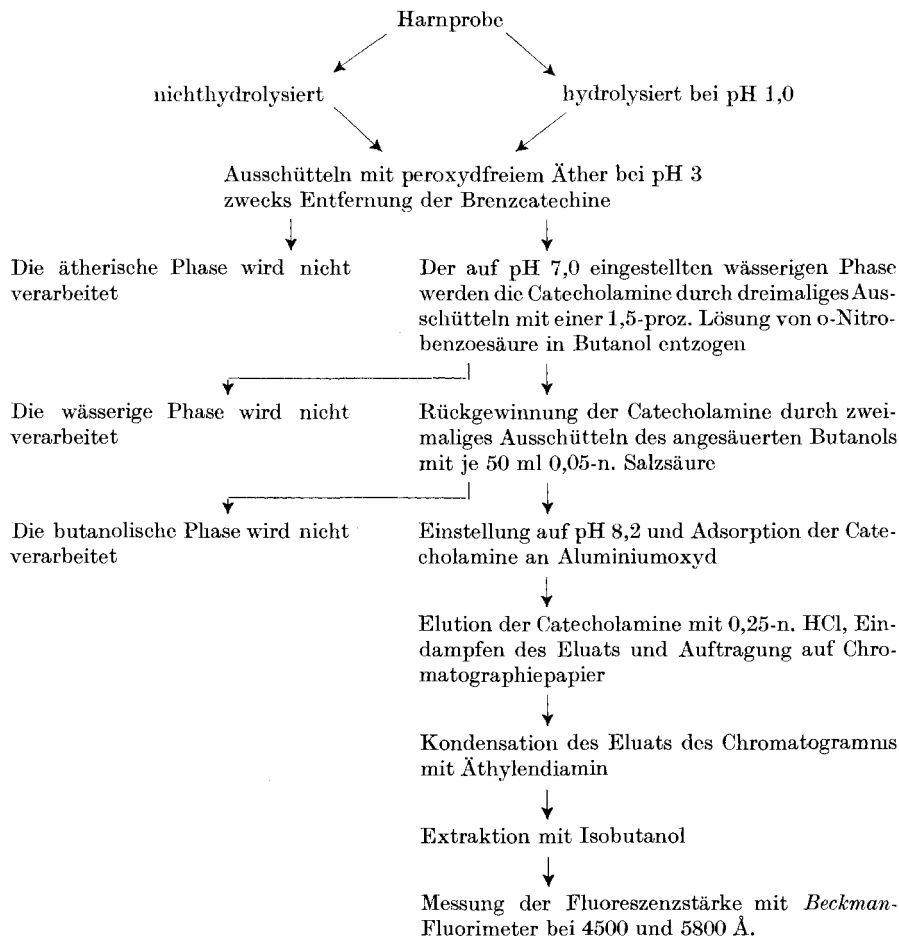
Verteilungsgleichgewicht des Adrenalins zwischen einer wässrigen und einer organischen Phase in Abhängigkeit des pH.

- 1) *J. C. Whitehorn*, *J. biol. Chemistry* **108**, 633 (1935).
- 2) *F. H. Show*, *Biochem. J.* **32**, 19 (1938).
- 3) *W. Raab*, *Biochem. J.* **37**, 470 (1943).
- 4) *P. K. Holtz & K. Credner*, *Arch. exper. Pathol. Pharmacol.* **200**, 355 (1943); **204**, 228 (1947); **209**, 350, 364 (1950).
- 5) *U. S. v. Euler*, *Ergebn. Physiol.* **46**, 261 (1950); *Pharmacol. Rev.* **3**, 247 (1951).
- 6) *H. Weil-Malherbe & A. A. Bone*, *Biochem. J.* **51**, 311 (1952); **58**, 132 (1954).
- 7) *A. Lund*, *Acta pharmacol. (Kopenh.)* **5**, 121, 231 (1949).

mit angesäuertem Butanol, wobei als Säurezusatz *o*-Nitrobenzoesäure diente. Ihre K_s liegt bei $6,16 \times 10^{-1}$, und sie ist in Wasser nur zu 0,65% löslich. Wie Fig. 1 zeigt, gelingt es mit Hilfe von Butanol, das 1,5% *o*-Nitrobenzoesäure enthält, 85–90% des Adrenalins zu extrahieren. Die wässrige Phase soll ein pH 7,0 bis 7,5 haben.

Gang der Isolierung und Trennung der einzelnen Catecholamine des Harnes.

Die Catecholamine kommen im Harn sowohl frei wie an Schwefel- oder Glucuronsäure gebunden vor. Zwecks Freimachung der gebundenen Catecholamine muss der Harn bei pH 1,0 im kochenden Wasserbade 20 Min. erwärmt werden. Die Weiterverarbeitung erfolgt nach folgendem Schema.



Nach diesem Verfahren bestimmten wir an einzelnen Tagen bei einigen Personen den Gehalt des Harnes an freien und gebundenen Catecholaminen.

Man erkennt, dass normalerweise bedeutend mehr von der Noradrenalin- als von der Adrenalinfraktion ausgeschieden wird, dass ein grosser Teil beider Fraktionen erst nach der Hydrolyse frei wird und dass das Adrenalin zu einzelnen Tageszeiten fehlen kann, z. B. bei vollkommener Ruhe.

Tabelle 1.

Gehalt des menschlichen Harnes an freien und gebundenen Catecholaminen.

Versuchs- person	Noradrenalinfraktion in $\gamma\%$			Adrenalinfraktion in $\gamma\%$		
	frei	gebunden	gesamt	frei	gebunden	gesamt
Go	12,58	8,92	21,00	3,60	2,4	6,0
Go	13,00	5,80	18,80	4,20	3,3	7,5
Go	17,00	11,50	28,50	1,60	6,40	8,0
Go	12,90	11,10	24,0	3,6	4,4	8,0
Go	15,50	16,50	32,0	0,0	2,6	2,6
Go	16,00	15,0	31,0	2,8	8,8	11,60
Go	12,80	11,2	24,0	0,0	0,0	0,0
Bi	11,64	14,56	26,20	2,8	3,50	6,30
Bi	16,40	12,40	28,80	0,0	4,10	4,10
Bi	18,00	17,0	35,00	0,0	1,8	1,80
Mittelwert	14,58	12,40	26,91	1,86	3,73	5,59

B) Papierchromatographische Trennung der Catecholamine. Eine weitere Aufteilung der Catecholamine des Harnes ist nur unter Zuhilfenahme der Papierchromatographie möglich. Wir benutzten dabei einen Glaszylinder von 45 cm Höhe und 17 cm Durchmesser. Der Deckel enthielt ein Zu- und Ableitungsrohr. Vor der Analyse wurde durch das Gefäß ein gereinigter und mit H_2SO_4 getrockneter Kohlendioxidstrom durchgeleitet.

Das Chromatographiepapier *Whatman* Nr. 1 wurde zuerst in grossen Glasschalen 24 Std. in eine 0,5-n. Salzsäurelösung gebracht, mehrmals mit dest. Wasser gewaschen und getrocknet. Das so vorbereitete Papier wurde zwecks Entfernung von Metallspuren 24 Std. in ein 0,1% Komplexon II enthaltendes Bad gelegt. Das an der Luft getrocknete Papier wurde mit dest. Wasser gewaschen und wieder getrocknet.

Ein so vorbehandelter Papierbogen von 45 cm Länge und 35 cm Breite wurde in 4 Zonen eingeteilt. Die zu analysierenden Proben wurden 5 cm vom unteren Rand aufgetragen. Als Vergleichsprobe diente eine wässrige Lösung von je 10 γ Adrenalin, Noradrenalinhydrochlorid und Hydroxytyramin. Der zu untersuchende Harnauszug kam in die Mitte des Papierbogens. Derselbe wurde in den Glaszylinder gebracht. Als Lösungsmittel diente entweder eine Phenol/HCl-Mischung (85 ml eines frisch über Zinkstaub destillierten Phenols + 15 ml 0,1-n. HCl) oder eine Butanol/n. HCl-Mischung. Nach Durchleiten eines kräftigen, trockenen CO_2 -Stromes während $\frac{1}{2}$ Std. wurde das Ganze 36—48 Std. stehengelassen. Darauf wurde das Papier mit reinem Benzol behandelt und an der Luft getrocknet. (Das verwendete Benzol wurde mit konz. Schwefelsäure ausgeschüttelt, mit Wasser gewaschen, getrocknet und frisch destilliert.) Die Kontrollstreifen wurden herausgeschnitten, mit 0,44-proz. Kaliumferricyanidlösung entwickelt und die Rf-Werte des Adrenalin, Noradrenalin und Hydroxytyramin ermittelt (vgl. Fig. 2).

Die der Lage des Adrenalin, Noradrenalin und Hydroxytyramin entsprechenden Stellen des zu analysierenden Streifens wurden herausgeschnitten, zwischen zwei Glasplatten eingeklemmt und 24 Std. mit 0,05-n. HCl behandelt. Die von den einzelnen, zungenförmig zugespitzten Papierstellen in Tropfen abfliessende Flüssigkeit wurde in einzelnen kleinen Bechergläsern aufgefangen. Zur Vermeidung einer zu starken Verdampfung befand sich die ganze Elutionsvorrichtung in einem abgedichteten, feuchten Glasgefäss.

Die so gesammelten Eluate wurden dreimaliges Ausschütteln mit je 10 ml peroxydfreiem Äther von anhaftenden Phenolspuren befreit. 5 ml der so behandelten Lösung wurden mit 5 ml Wasser verdünnt und mit 0,5 ml 2-n. Äthylendiamin-hydrochlorid-Lösung und 0,7 ml Äthylendiamin versetzt. Nach Einstellung des pH-Wertes auf

10,4 wurde 20 Min. bei 50° auf dem Wasserbade erwärmt. Nach Abkühlung wurden 4 g analysenreines NaCl und 6 ml Isobutanol zugegeben, die Mischung während 5 Min. umgerührt und dann zentrifugiert. 5 ml des Isobutanolauszuges dienten zur Fluoreszenzmessung bei 5800 und 4500 Å.

Ausser Adrenalin, Noradrenalin und Hydroxytyramin waren noch unbekannte, den Catecholaminen ähnliche Stoffe in kleinsten Mengen vertreten. Ihre Fluoreszenzstärke wurde bestimmt und als dem Adrenalin äquivalent gesetzt und als „Restbrenzcatechine“ bezeichnet.

Gang der Berechnung: Es bedeuten

„N“ (Noradrenalin-Catecholaminfraktion) = $mn(b-y)/(m-n)$.

„A“ (Adrenalinfraktion) = $(y-N)/m = (b-N)/n$.

m = Verhältnis der Fluoreszenz von Adrenalin: Noradrenalin, gemessen mit gelbem Filter.

n = Verhältnis der Fluoreszenz von Adrenalin: Noradrenalin, gemessen mit blaugrünem Filter.

y = Adrenalinmenge bei der Messung mit gelbem Filter.

b = Adrenalinmenge bei der Messung mit blaugrünem Filter.

A = Adrenalin in der zu untersuchenden Lösung.

N = Noradrenalin (Catecholamine) in der zu untersuchenden Lösung.

m = Standardwert des Adrenalin, dividiert durch den Standardwert des Noradrenalin = $100/40 = 2,5$ (bei gelbem Filter).

n = Standardwert von Adrenalin, dividiert durch den Standardwert von Noradrenalin = $14,2/15 = 0,95$.

$m_1 - n_1/(m - n) = 1,53$.

In bezug auf weitere Einzelheiten der Methodik verweisen wir auf unsere frühere Arbeit (Biochem. Z. **327**, 72 (1955)) sowie auf die ausführlichen Angaben von *Weil-Malherbe*⁶⁾, *v. Euler*⁵⁾ und *Lund*⁷⁾.

Papierchromatographische Trennung von Adrenalin, Noradrenalin und Hydroxytyramin.

Lösungsmittel: Phenol/0,1-n. HCl (CO₂-Atmosphäre).

Entwicklung: 0,44% K₃(Fe(CN)₆), pH 7,8.

Fronthöhe: 37 cm

Rf-Werte: Noradrenalin 0,18 Hydroxytyramin 0,36 Adrenalin 0,46.

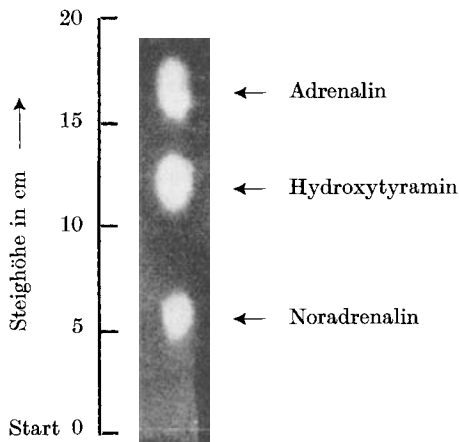


Fig. 2.

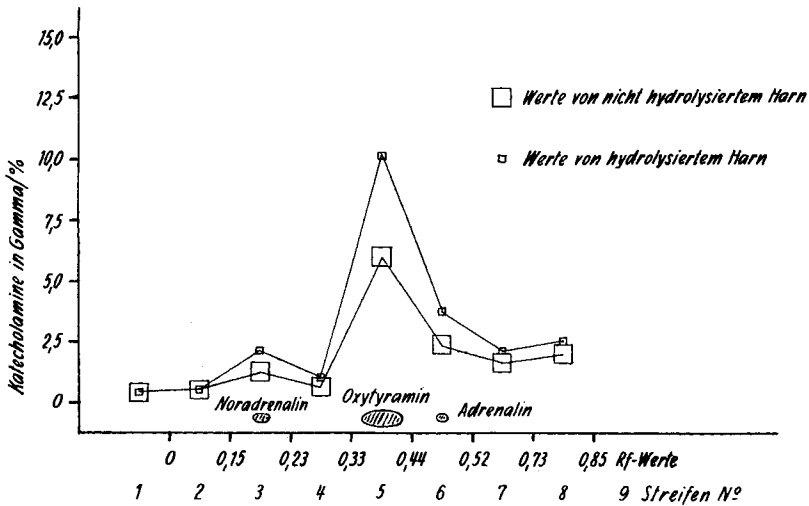


Fig. 3.

Papierchromatographische Trennung der Catecholamine in Harnextrakten.
Lösungsmittel Phenol/HCl.

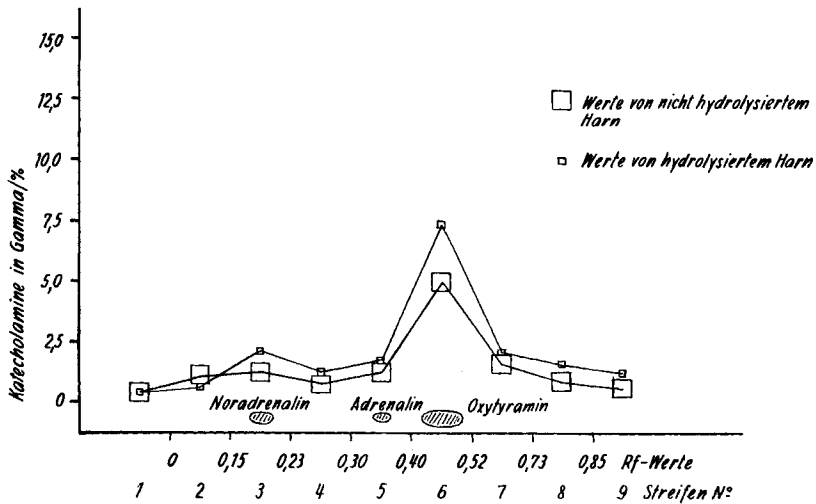


Fig. 4.

Papierchromatographische Trennung der Catecholamine in Harnextrakten.
Lösungsmittel Butanol/HCl.

Durch die papierchromatographische Untersuchung wurde nachgewiesen, dass Hydroxytyramin, Noradrenalin und Adrenalin zu den regelmässigen Harnbestandteilen gehören. Die Fluoreszenz der leeren Fraktionen deutet darauf hin, dass in den Harnextrakten noch andere, nicht identifizierte, sogenannte „Restbrenzcatechine“ vorhanden sind.

In einer soeben erschienenen Arbeit berichtete *U. S. von Euler*⁸⁾ über chromatographische Untersuchungen von Harnextrakten. Im Gegensatz zu unserer Arbeitsweise reinigte *U. S. von Euler* seine Harnextrakte nur durch Adsorption am Al_2O_3 , welches sämtliche Brenzcatechine bindet. *U. S. von Euler* konnte in seinen Chromatogrammen einen vierten Stoff nachweisen, dessen Identität dem Rf-Wert nach der Dihydroxyphenyl-essigsäure entsprechen würde. In unseren Harnextrakten wurden die sauren Brenzcatechine vor der Adsorption durch Ausschütteln mit peroxydfreiem Äther und Butanol eliminiert, und deshalb haben wir die Dihydroxyphenyl-essigsäure nicht feststellen können. Immerhin zeigen in unseren Chromatogrammen die Streifen 7 und 8 eine erhöhte positive Fluoreszenz, und da der Rf-Wert dieser Streifen dem der Dihydroxyphenyl-essigsäure entspricht, ist es möglich, dass bei unserer Extraktion noch Spuren dieses Stoffes mitgekommen sind. Bei der Extraktion konnten wir auch feststellen, dass nach Ausschüttelung der Harnproben mit peroxydfreiem Äther ca. 30–40% der Fluoreszenzstärke verlorengehen. Es ist anzunehmen, dass die Dihydroxyphenyl-essigsäure bzw. andere Abbauprodukte der Catecholamine in die ätherische Phase übergehen.

II. Bestimmung der Brenzcatechine des Harnes.

Neben den Catecholaminen kommen im Harn noch weitere desaminierte Substanzen mit 2 Hydroxylen in Orthostellung vor, wie z. B. Umwandlungsprodukte des Adrenalin, Noradrenalin, Hydroxytyramin und dgl. Die Bestimmung dieser Produkte kann in gewissen Fällen von Interesse sein. Die Kondensation mit Äthylendiamin eignet sich dafür sehr gut, da dabei nur o-Chinone erfasst werden. Bei diesen Analysen verfahren wir wie folgt:

100 ml eines 10fach verdünnten Harnes werden mit 1 ml einer 20-proz. Lösung von Aluminiumsulfat versetzt. Durch vorsichtige Zugabe von 0,5-n. NaOH wurde die Harnprobe auf den pH 7,6 gebracht. Der so gebildete Niederschlag von $\text{Al}(\text{OH})_3$ wurde abzentrifugiert und 3mal mit je 5 ml H_2O gewaschen. Dann wurde der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Niederschlag in einem Minimum von 2-n. H_2SO_4 aufgelöst und mit H_2O auf 5 ml verdünnt. Bei starkem Rühren wurde die Lösung durch Zugabe von 0,5-n. NaOH auf pH 3,5 eingestellt. Dann wurde eine Mischung von 4 Volumen Alkohol-Aceton zwecks Fällung von anorganischen Salzen zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei 0° stengelassen, dann abfiltriert und im Vakuum auf ein Volumen von 5 ml eingedampft. Das so erhaltene Extrakt wurde auf 20 ml verdünnt, und je 1 ml davon wurde zur quantitativen, fluorimetrischen Bestimmung der Brenzcatechine verwendet.

Zwecks Bestimmung der Gesamt-, d.h. der freien plus der gebundenen Brenzcatechine wurde eine parallele Probe von 100 ml verdünntem Normalharn auf pH 1 gebracht und 20 Min. bei 100° hydrolysiert. Der hydrolysierte Harn wurde dann wie eben geschildert weiterverarbeitet.

Der Harn wurde von 3 normalbeschäftigten Versuchspersonen zu verschiedenen Tageszeiten gesammelt. Die Fluoreszenzstärke wurde mit dem *Beckman*-Spectro-Fluorimeter unter Verwendung der Wolfram- oder Hg-Lampe und eines UV.-Filters gemessen. Die Werte wurden dem Adrenalin äquivalent gesetzt und aus einer Adrenalin-Eichkurve abgelesen. Die Resultate dieser Analysen sind in der Tab. 3 zusammengestellt.

⁸⁾ *Chr. v. Euler, U. S. v. Euler & I. Floding, Acta physiol. Scand.* **33**, Suppl. **118** (1955).

Tabelle 3.

Brenzcatechingegehalt des Harnes von gesunden Personen, in $\gamma\%$.

Versuchs- person	Brenzcatechingegehalt des Harnes in $\gamma\%$		
	frei	gebunden	gesamt
G	185	165	350
G	250	370	620
G	290	260	550
G	345	235	580
G	330	340	670
G	360	260	620
B	260	120	380
B	178	132	310
St	250	370	620

Besprechung.

Der Harn des Menschen enthält mehr Hydroxytyramin als Adrenalin und Noradrenalin (Holtz, Credner & Koepf⁹⁾, U. S. v. Euler, Hamberg & Hellner¹⁰⁾). Auch in unseren Versuchen überwog die Menge des Hydroxytyramins diejenige des Adrenalins oder Noradrenalins (13,30 und 9,10 $\gamma\%$ gegenüber 0,65 und 2,0 bzw. 3,20 und 3,35 $\gamma\%$). Die Unkenntnis der genauen Herkunft des Hydroxytyramins erschwert eine richtige Beurteilung dieses Befundes. Die einzelnen Stufen der Adrenalinsynthese werden oft wie folgt dargestellt. Phenylalanin \rightarrow Tyrosin \rightarrow Hydroxytyrosin (Dihydroxyphenylalanin, Dopa) \rightarrow Hydroxytyramin \rightarrow am β -C-Atom hydroxyliertes Hydroxytyramin (p-Hydroxyphenyl-äthanolamin) \rightarrow Noradrenalin \rightarrow Adrenalin. Beyer, Blaschko, Burn & Langeman¹¹⁾ vermuten auch einen direkten Übergang des Dihydroxyphenylserins in Noradrenalin. Demnach steht das Hydroxytyramin an der Spitze der Reaktionen, welche den Übergang der pharmakologisch inaktiven Aminosäuren in die hochaktiven Catecholamine einleiten. Man wäre geneigt, aus der Menge des Dihydroxytyramins einen indirekten Schluss auf den Umfang der Adrenalinsynthese zu ziehen. Für diese Annahme würde das Vorkommen des Hydroxytyramins in verschiedenen Organen sowie in Auszügen aus den Nebennieren sprechen (Goodall¹²⁾). Bei der Reizung adrenergischer Nerven hat man aber bis dahin Noradrenalin, aber kein Hydroxytyramin feststellen können. Die Bildung des Hydroxytyramins dürfte eher in die chromaffinen Zellen verlegt werden.

⁹⁾ P. Holtz, K. Credner & W. Koepf, Arch. exper. Pathol. Pharmacol. **200**, 356 (1942).

¹⁰⁾ U. S. v. Euler, U. Hamberg & S. Hellner, Biochem. J. **49**, 655 (1951).

¹¹⁾ K. H. Beyer, H. Blaschko, J. H. Burn & H. Langemann, Nature **165**, 926 (1950).

¹²⁾ Mc. Ch. Goodall, Acta physiol. Scand. **24**, Suppl. 85 (1951).

Über die Absonderung des Adrenalins und des Noradrenalins ist man etwas besser unterrichtet. Fast durchweg ist die Ausscheidung des Noradrenalins höher als die des Adrenalins; dies war auch in unseren Versuchen der Fall. Genaue Zahlen lassen sich nicht anführen, weil die Werte der biologischen und der chemischen Bestimmung nicht direkt miteinander vergleichbar sind.

U. S. v. Euler gibt die Adrenalinausscheidung innerhalb von 24 Std. mit 5 γ und die des Noradrenalins mit 20 bis 40 γ an. Die Adrenalinausscheidung richtet sich nach der körperlichen und seelischen Beanspruchung: Arbeitsleistung, starke Aufregungen, Infektionskrankheiten, operative Eingriffe steigern die Adrenalinausscheidung. Bei Geschwülsten des chromaffinen Gewebes, bei den sogenannten Phäochromocytomen ist die Adrenalin-Noradrenalinausscheidung stark erhöht, wobei in einigen Fällen praktisch nur der Noradrenalin, in anderen auch der Adrenalinhalt vermehrt ist. Bei dieser Erkrankung ist die hier beschriebene Trennung der einzelnen Catecholamine von besonderem Wert. Eine Vermehrung der Adrenalinausscheidung findet sich auch in gewissen Typen des Hochdruckes des Menschen.

Bei der sogenannten essentiellen Hypertonie konnten *Kronberg & Schümann*¹³⁾ mit Hilfe der älteren Methode von *Shaw* eine Zunahme des Gesamtbrenzcatechingehaltes des Harnes feststellen; die hier beschriebene fluorimetrische Methode dürfte den Anforderungen der Praxis besser entsprechen.

Zusammenfassung.

Als Vertreter der Catecholamin-Reihe treten im menschlichen Harn Adrenalin, Noradrenalin und Hydroxytyramin auf. Mengenmässig überwiegt das Hydroxytyramin, ihm folgt das Noradrenalin, während das Adrenalin in geringster Menge vorkommt und zeitweise sogar fehlen kann. Daneben findet man verschiedene Brenzcatechine sowie kleine Mengen undefinierter Catecholamine. Es werden papierchromatographische und fluorimetrische Methoden zur Trennung und Bestimmung der Catecholamine und Brenzcatechine angegeben.

Medizinisch-chemisches Institut der Universität Bern.

¹³⁾ *C. Kronberg & J. Schümann*, Arch. exper. Pathol. Pharmacol. **209**, 350 (1950).