

## ÉTUDE DE L'ISOLEMENT DES CATÉCHOLAMINES URINAIRES AU MOYEN DE L'ALUMINE, EN VUE DE LEUR DOSAGE CHIMIQUE

GUY NADEAU ET GEORGES SOBOLEWSKI

*Laboratoire de Biochimie, Hôpital Saint-Michel Archange et Département de Psychiatrie,  
Université Laval, Québec (Canada)*

(Reçu le 2 décembre 1960)

### INTRODUCTION

Le dosage chimique des catécholamines urinaires a donné lieu à de nombreux travaux. Il reste que ces analyses sont considérées, à juste titre, comme extrêmement délicates et peu sûres. Quelle que soit la technique, elle procède invariablement par deux étapes: l'isolement des catécholamines et leur conversion en dérivés dont on mesure la fluorescence. Jusqu'à maintenant on a attaché une importance toute particulière tant aux conditions de formation des dérivés qu'à la manière d'apprécier la fluorescence. Il est cependant remarquable que les données expérimentales sur la première partie du dosage, à savoir l'isolement des catécholamines, soient pratiquement inexistantes, si l'on en excepte les observations de LUND<sup>1</sup> qui remontent déjà à une dizaine d'années. Il s'agit là d'une déficience qui a d'ailleurs été particulièrement signalée au cours d'un symposium récent<sup>2</sup>.

Toute technique d'isolement des catécholamines urinaires par chromatographie sur alumine doit répondre aux exigences suivantes: (a) elle doit être reproductible, sinon quantitative; (b) elle doit éliminer toute substance pouvant gêner la détermination fluorimétrique et (c) elle doit éviter l'altération des catécholamines au cours des opérations, en particulier au cours de l'adsorption.

Une étude minutieuse des travaux antérieurs montre que les difficultés rencontrées par leurs auteurs ont leur origine à cette étape et se rattachent à l'une ou l'autre des conditions suivantes:

(a) Écarts parfois considérables dans le rendement. Un travail récent<sup>3</sup>, qui rapporte sans commentaires des rendements variant de 15 à 94 %, laisse quelque doute sur la validité de la reproduction.

(b) Élimination des substances fluorescentes de l'urine. Cet obstacle est surmonté si l'on possède un moyen adéquat de mesurer les valeurs du blanc, mais tel ne semble pas toujours le cas<sup>3</sup>.

(c) Impuretés provenant de l'alumine elle-même et susceptibles de fausser la détermination fluorimétrique, comme l'a signalé CROUT<sup>4</sup>. De leur côté, PRICE ET PRICE<sup>5</sup> signalent une différence dans les valeurs de fluorescence des catécholamines

(par formation des lutines) suivant qu'elles sont dissoutes dans un acide qui a passé ou non sur une colonne d'alumine. Il y a là un indice que l'alumine n'agit pas seulement comme adsorbant.

(d) Enfin, la possibilité d'une transformation partielle des catécholamines par passage sur alumine, a été soulevée par JONES ET BLAKE<sup>6</sup> pour expliquer certaines particularités dont nous allons discuter plus loin.

Malgré ces nombreux indices, une étude systématique du rôle de l'alumine comme agent adsorbant des catécholamines (plus particulièrement de l'adrénaline et de la noradrénaline) faisait jusqu'à maintenant défaut. C'est l'intention du présent travail de parer à cette déficience et de suggérer un mode opératoire qui soit expérimentalement éprouvé.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

##### *Matériel et méthode*

##### *Réactifs*

1. Adrénaline, c.p. (Distillation Products).
2. Bitartrate de noradrénaline, c.p. (Winthrop-Stearns).
3. Bitartrate de  $\beta$ -<sup>14</sup>C-adrénaline (Tracerlab).
4. Alumines: Brickman Company (Montréal); Woelm ("non alkaline"); Merck ("suitable for chromatographic adsorption"); échantillons L-93-8 et L-93-12 (Aluminium Laboratories Limited, Arvida, Canada).

##### *Dosage des catécholamines*

Le dosage des catécholamines a été effectué par l'intermédiaire des lutines, suivant une méthode adaptée de EHRLÉN<sup>7</sup> et de VON EULER ET FLODING<sup>8</sup>. La manière d'apprécier les blancs a été légèrement modifiée. Pour les mesures simultanées de l'adrénaline et de la noradrénaline, nous avons adopté la technique d'excitation de la fluorescence par deux longueurs d'onde différentes: un procédé analogue a été employé par PRICE ET PRICE<sup>5</sup>. La fluorescence a été mesurée avec un fluorimètre construit sur place, utilisant le circuit électronique du spectrophotomètre Beckman, modèle B, et plus tard relié au Microphotomètre Aminco. On a utilisé les filtres suivants:

Filtres primaires: Corning 7-83 isolant la raie de 365  $m\mu$  du mercure; Corning 5-74 ou filtre d'interférence (Photovolt) isolant la raie 436  $m\mu$ ; filtre secondaire: Corning 3-69 (jaune).

Nous avons aussi vérifié que le photofluorimètre Coleman possède une sensibilité suffisante pour ces déterminations.

##### *Choix de la méthode d'adsorption*

L'isolement des catécholamines par adsorption et élution successive peut s'effectuer, soit en agitant une suspension d'alumine dans la solution contenant les catécholamines, puis dans une solution éluante (méthode en équilibre), soit en laissant percoler la solution de départ à travers une couche d'alumine immobilisée dans une colonne (chromatographie proprement dite). Le deuxième procédé est infiniment plus efficace

pour séparer des substances aux propriétés semblables. Or les séparations que l'on veut obtenir, dans le cas présent, sont plutôt simples: d'une part à cause de la grande spécificité de la réaction de formation des lutines et, d'autre part, à cause de la facilité d'évaluer le blanc de fluorescence, comme on le verra plus loin. Dans ces conditions, la méthode d'adsorption et d'élution en équilibre devient le procédé de choix pour les analyses de routine où l'on peut consentir à une faible diminution du rendement au profit d'une manipulation plus simple, plus rapide et offrant les mêmes garanties de précision. C'est le procédé adopté dans la présente étude. Pour des raisons de commodité d'expression et à l'instar des autres auteurs, nous continuerons à l'identifier par le terme de *chromatographie sur alumine*.

#### *Choix de l'alumine*

Le choix de l'alumine en vue de la chromatographie mérite une attention certes plus grande qu'on ne lui en a accordée jusqu'à maintenant. La chromatographie consiste en une adsorption des molécules des catécholamines sur la surface même des grains d'alumine, suivie d'une élution. L'efficacité de cette opération dépend donc grandement de l'état physicochimique de la surface (forme cristalline, grandeur de surface active). Comme on peut s'y attendre, les aluminés à grande surface donnent des rendements plus élevés. Mais il y a un autre facteur dont il faut tenir compte: c'est l'influence que peut avoir l'alumine passée en solution ou en dispersion colloïdale sur la fluorescence finale des catécholamines. En effet, plus il y a d'alumine en solution, moins la fluorescence spécifique est intense et plus le spectre est déformé, ce qui entraîne de graves erreurs dans les résultats<sup>4, 5</sup>.

Or il arrive que ce sont, parmi les aluminés que nous avons étudiés, celles dont la surface active est la plus grande qui montrent le plus de facilité à passer en solution et donnent les valeurs de fluorescence spécifique\* les moins élevées. Dans le Tableau I, nous avons réuni ces caractéristiques pour trois aluminés commerciales, une alumine traitée sur place (voir description au chapitre suivant) et un échantillon expérimental.

La fluorescence spécifique a été déterminée en ajoutant les deux catécholamines à de l'acide sulfurique 0.2 *N* qui avait été agité auparavant avec chacune des aluminés mentionnées (le choix de l'acide est discuté plus loin). On constate que cette fluorescence est la plus faible pour les aluminés de Woelm et de Merck, et la plus forte pour celles de Brickman, traitée ou non.

La facilité qu'ont les aluminés de passer en solution dans l'acide sulfurique 0.2 *N* a été appréciée en comparant la turbidité produite à pH 8 (minimum de solubilité pour l'oxyde d'alumine) et la diffusion de lumière à pH 8 et à pH 14 (le pH de la mesure fluorimétrique finale). On remarque que ce sont encore les aluminés de Merck et de Woelm qui se dissolvent le plus facilement, tandis que celles de Brickman sont les moins solubles.

---

\* Au cours du présent travail, on appellera *fluorescence spécifique* la fluorescence de 0.6  $\mu\text{g}$  de noradrénaline et de 0.15  $\mu\text{g}$  d'adrénaline (soit une fraction de 1.5 ml sur 5.0 ml d'éluat) dans un volume final de 7.2 ml. (Voir *Mode opératoire*.)

TABLEAU I

QUELQUES CARACTÉRISTIQUES DES DIVERSES PRÉPARATIONS D'ALUMINE; LEURS INFLUENCES SUR L'EFFICACITÉ DE LA CHROMATOGRAPHIE ET LA MESURE DE LA FLUORESCENCE

Alumine	Rendement (%)		Fluorescence spécifique <sup>a</sup>				Blancs de fluorescence		Alumine en solution <sup>b</sup>			Surface interne (m <sup>2</sup> /g)
	Norad.	Adr.	Noradrénaline		Adrénaline		365 mμ	436 mμ	Turbidité <sup>c</sup>	Diffusion <sup>d</sup>		
			365 mμ	436 mμ	365 mμ	436 mμ				pH 8	pH 14	
Brickman	69	41	51.5	32	19	46.5	7	16	6.5	8	20	9.1
Brickman lavée	84	34	53.5	37	20.5	47	6	13.5	4.0	2.5	15	10.9
L-93-8	105	50	49.5	34	18.5	43	7.5	16	12.0	24	16.5	23.1
Merck	86	47	35.5	25.5	15	35.5	17	24	17.0	48	12.5	—
Woelm	85	74	40	28	20	46	15	23	39.0	100	50	91.5
(Éluant pur)			58.5	37	22.5	50	6.5	15				

<sup>a</sup> Les unités sont arbitraires: une solution de référence (fluorescéine à 10 μg/l, tamponnée à pH 8.2) correspond à 15 unités à 365 mμ et à 80 unités à 436 mμ. Les valeurs sont corrigées pour celles des blancs.

<sup>b</sup> Les mesures de la turbidité et de la diffusion de la lumière sont des valeurs moyennes; les autres chiffres sont des valeurs typiques d'une seule détermination.

<sup>c</sup> La turbidité fut mesurée au Photometer Rouy-Leitz en pourcentage d'absorption.

<sup>d</sup> La diffusion lumineuse fut mesurée au fluorimètre avec deux filtres, primaire et secondaire, de même longueur d'onde (436 mμ). Les unités sont arbitraires.

<sup>e</sup> Mesurée par adsorption d'azote. Ref.<sup>10</sup>.

On remarque par ailleurs que les alumines les plus solubles (L-93-8, Woelm) possèdent les surfaces actives les plus grandes et donnent, en partant de solutions pures des catécholamines, un meilleur rendement chromatographique.

On est donc amené à choisir entre les alumines à bon rendement, à fluorescence spécifique faible avec spectre déformé et les alumines à rendement plus faible mais permettant de développer une fluorescence se rapprochant de celles des solutions pures.

Nous avons opté pour les secondes, leur faible solubilité offrant les meilleures garanties de reproduction, par contraste avec les alumines du genre "solubles" dont la reproduction est moins sûre.

#### Traitement de l'alumine

Pour nous assurer une qualité plus uniforme de l'alumine, nous avons mis au point un procédé de lavage et de séchage. En fait, on doit considérer cette opération comme un traitement physico-chimique beaucoup plus qu'un simple lavage. L'alumine est traitée par l'acide chlorhydrique azéotropique dans un extracteur Soxhlet pendant au moins une journée entière, puis rincée à plusieurs reprises avec de l'eau distillée. L'extraction au Soxhlet est ensuite reprise avec de l'acide acétique glacial pour une autre journée. Suit alors une longue série de lavages à l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de lavage, trouble au début, devienne parfaitement limpide. On sèche alors à 400° pour deux à trois heures. Un séchage plus court ou plus prolongé diminue l'activité de l'alumine et conséquemment le rendement d'adsorption, comme l'illustrent les quelques données du Tableau II.

Il est intéressant de noter que l'acide chlorhydrique ayant servi à l'extraction de l'alumine se colore fortement en jaune et renferme (comme d'ailleurs aussi l'acide acétique de la seconde extraction) un fort résidu solide. Or on sait que les diverses formes d'alumine calcinée sont insolubles dans ces acides. On peut donc en conclure que ces résidus proviennent principalement d'impuretés et très probablement d'alumine hydratée ou carbonatée.

Dans le but de se mettre à l'abri des variations dues à des lots différents, il est suggéré d'en étudier la solubilité (par des mesures de turbidité et de dispersion lumineuse) dans les conditions opératoires et de procéder à un traitement, le cas échéant.

TABLEAU II  
INFLUENCE DU TEMPS DE SÉCHAGE DE L'ALUMINE  
(à 400°) SUR LA RÉCUPÉRATION DE L'ADRÉNALINE ET DE LA NORADRÉNALINE \*

Durée du séchage (heures)	Pourcentage de récupération	
	Adrénaline**	Noradrénaline**
0	0	0
1	19	24
2	31	61
3	31	57
20	40	38

\* Dans cette expérience, comme dans les suivantes, l'alumine utilisée fut celle de Brickman (à moins qu'on ne le spécifie autrement).

\*\* En solution dans 20 ml d'urine et 20 ml d'eau.

#### *Chromatographie de solutions aqueuses de mélanges de catécholamines*

Dans le cas qui nous intéresse, le résultat final de la séparation chromatographique dépend, en plus de l'état physicochimique de l'adsorbant, des facteurs suivants: (a) de l'état d'ionisation de la molécule des catécholamines, (b) du rapport des volumes des deux phases en présence (ou, plus exactement, du rapport entre le volume de la phase liquide et la surface active du solide), (c) de la nature chimique de l'éluat et enfin (d) de la présence d'autres substances pouvant entrer en compétition avec les catécholamines. Pour mieux mettre en évidence l'effet des trois premiers facteurs (a), (b) et (c), nous avons d'abord procédé à l'étude de solutions des catécholamines dans l'eau pure. Le dernier facteur sera étudié au chapitre de la chromatographie des urines.

(a) *État de la molécule des catécholamines.* L'adrénaline et la noradrénaline sont des molécules amphotères dont la charge électrique dépend du pH du milieu. On sait qu'en milieu alcalin, la molécule possède une charge négative et est fortement adsorbée sur l'alumine, alors qu'en milieu acide le renversement de la polarité lui fait perdre toute affinité pour l'adsorbant. Dans ce domaine, nous n'avons fait que confirmer le bien-fondé des conditions adoptées par les premiers chercheurs<sup>1</sup>: l'adsorption est à son maximum à pH 8-9, diminue rapidement avec le pH pour devenir négligeable en solution acide.

(b) *Influence du volume de la phase liquide.* L'efficacité de l'adsorption, en outre du pH d'équilibre, dépend grandement du volume initial de la solution utilisée (pour une quantité donnée d'alumine). C'est un facteur dont on ne semble pas avoir tenu suffisamment compte jusqu'à maintenant. En effet, plus le volume de la solution des catécholamines est grand, plus la fraction non adsorbée est abondante. La Fig. 1

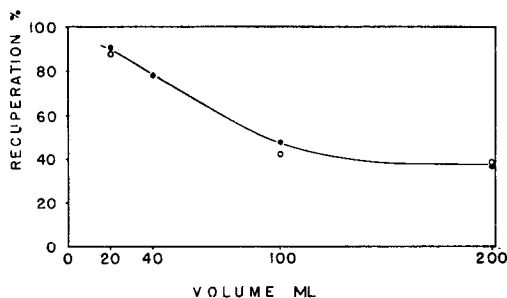


Fig. 1. Influence du volume de la phase liquide sur l'efficacité de l'adsorption. O, Noradrénaline, ●, Adréraline.

rend compte de l'ordre de grandeur de cet effet. Les conclusions de cette expérience sont évidentes: (a) il y a avantage à prendre des volumes faibles et (b) il est nécessaire de garder le volume constant.

(c) *Choix de l'éluant.* Dans le choix de l'éluant, on doit se guider non seulement sur sa faculté de faire passer, de l'alumine à la solution, les catécholamines, mais aussi sur l'influence qu'il exerce sur la fluorescence finale. Cette influence se fait sentir à deux niveaux: sur le rendement dans la formation des lutines (c'est le cas de l'acide oxalique) et aussi sur la mesure même de la fluorescence à cause de son pouvoir de mise en solution de l'alumine.

Les solutions éluantes que nous avons étudiées nous ont été inspirées par les chercheurs avant nous: solutions d'acide sulfurique 0.2 N, d'acide acétique 0.2 N et d'acide oxalique N.

La première particularité que l'on observe est la suivante: si l'on forme les lutines en partant de catécholamines dissoutes dans des solutions pures des acides mentionnés, on constate que l'intensité de la fluorescence, de même ordre de grandeur pour les acides acétique et sulfurique, est de beaucoup plus basse pour l'acide oxalique (Tableau III). Dans le but de corriger cet inconvénient, PEKKARINEN ET PITKÄNEN<sup>9</sup> suggèrent de diluer l'éluat dix fois avant d'effectuer la réaction. Ce procédé nous a paru peu intéressant car il diminue la concentration des catécholamines tout en augmentant la proportion relative des réactifs et conséquemment des blancs. Pour cette raison, l'étude de l'acide oxalique ne fut pas poussée plus loin.

On constate aussi que la fluorescence spécifique développée après agitation de l'éluat avec l'alumine est plus faible que dans l'éluat pur, l'abaissement est plus marqué pour l'acide sulfurique que pour l'acide acétique. Cependant pour une raison que nous n'avons pas pu élucider, la reproduction est nettement meilleure avec l'acide

sulfurique (coefficient de variation pour 10 échantillons,  $v = 2.0\%$ ) qu'avec l'acide acétique ( $v = 6.5\%$ ). C'est pour cette raison que notre choix final s'est porté sur l'acide sulfurique.

TABLEAU III

FLUORESCENCE DE L'ADRÉNALINE ET DE LA NORADRÉNALINE DANS DIVERS ÉLUANTS, PURS OU AGITÉS AVEC L'ALUMINE

Catécholamine en solution dans le solvant pur	Traitement subséquent	Intensité de la fluorescence*					
		Acide sulfurique 0.2 N		Acide acétique 0.2 N		Acide oxalique N	
		365 m $\mu$	436 m $\mu$	365 m $\mu$	436 m $\mu$	365 m $\mu$	436 m $\mu$
Noradrénaline	—	83.5	46.5	73	41.5	30.5	20.5
Noradrénaline	agitée avec alumine	50	39.5	65	40.5	24.5	16
Adrénaline	—	27.5	63	24	62.5	5.5	37
Adrénaline	agitée avec alumine	15.5	54	20	53	4.5	34

\* Unités arbitraires. Les valeurs sont corrigées pour les blancs. Solution de référence: voir Tableau I, note<sup>a</sup>.

#### Chromatographie des catécholamines dans les urines

Si l'on fait les expériences précédentes sur des urines placées dans les mêmes conditions que les solutions aqueuses, on note des différences très nettes. D'abord la récupération de catécholamines ajoutées à l'urine est définitivement inférieure; elle varie considérablement d'une urine à l'autre; enfin les écarts entre deux déterminations sur un même échantillon sont plus considérables.

C'est particulièrement le manque de fidélité dans la reproduction qui nous a paru le plus important à élucider. Le pH d'adsorption joue ici un rôle encore plus critique que dans les solutions aqueuses: non seulement des variations de l'ordre du dixième d'unité se traduisent par des écarts notables dans le résultat final, mais encore les tâtonnements eux-mêmes de l'ajustement peuvent lui être funestes. PRICE ET PRICE<sup>5</sup> d'ailleurs rejettent systématiquement les échantillons dont le pH a dépassé accidentellement la valeur désirée. Cet effet est plus critique pour certaines urines que pour d'autres: nous avons pu finalement le relier à leur teneur plus ou moins grande en phosphates. Apparemment l'alcalinisation des urines entraînerait une précipitation des phosphates à des pH légèrement variables pour des urines différentes, précipitation non complètement réversible au cours des réajustements de pH dans les intervalles considérés (*i.e.* de 8 à 9). Ce phénomène se répercuterait sur la fluorescence finale, soit par entraînement d'une partie des catécholamines par précipité de phosphates, soit par transfert des phosphates eux-mêmes jusqu'à l'éluat et reprécipitation dans le milieu final fortement alcalin.

Ce rôle des phosphates a été mis en évidence au cours d'une expérience où nous avons comparé l'efficacité de l'étape chromatographique sur les solutions suivantes:

- (1) Catécholamines ajoutées à de l'eau pure.
- (2) Catécholamines ajoutées à une suspension de phosphate ammoniac-magné-

sien (obtenu par précipitation d'urines avec l'ammoniaque et lavage du précipité avec de l'eau ammoniacale).

(3) Catécholamines ajoutées à une suspension identique de phosphate et d'un agent chélatant (EDTA). La quantité de EDTA était juste suffisante pour complexer l'ion  $Mg^{++}$  et empêcher ainsi la reprécipitation des phosphates à pH 8. Nous avons obtenu des rendements suivants: pour la noradrénaline 63.0 % et 67.5 % dans de l'eau pure; 16.0 % et 24.0 % dans la suspension de phosphate et de 36.3 % et 43.7 % dans le phosphate additionné de EDTA. (Les chiffres correspondants pour l'adrénaline sont: 44 %-36 %; 12.8 %-19.4 % et 15.2 %-14.6 %.)

On voit d'abord que la présence de phosphate, dissous ou non, abaisse la fluorescence finale moyenne. Cependant on remarque aussi que le reproduction, plutôt mauvaise en présence de phosphate, est améliorée par l'emploi du EDTA. Dans la pratique des dosages de routine, nous avons trouvé commode d'ajouter, sous forme solide, environ 100 mg de EDTA sodique aux 20 ml d'urine requis dans le mode opératoire suggéré plus loin. Exceptionnellement on est amené à en ajouter une petite quantité supplémentaire lorsque les urines affichent un trouble persistant.

Comme moyen d'améliorer le rendement de la chromatographie des urines, on peut invoquer l'avantage d'une dilution préalable de l'échantillon. Pour vérifier cette possibilité, nous avons ajouté à diverses dilutions d'une même urine des quantités connues, mais faibles des deux catécholamines (0.5  $\mu g$  d'adrénaline et 2.0  $\mu g$  de noradrénaline par 20 ml d'urine), quantités qui ne font que doubler approximativement les teneurs normales et ne doivent pas affecter ainsi l'efficacité de l'opération. Cette précaution est nécessaire si l'on veut reporter le résultat d'une telle expérience à l'échelle des catécholamines endogènes<sup>2</sup>. Le Tableau IV illustre le résultat d'une

TABLEAU IV  
EFFET DE LA DILUTION D'URINE SUR LA RÉCUPÉRATION D'ADRÉNALINE  
ET DE NORADRÉNALINE AJOUTÉES\*

Quantité (ml)		Pourcentage de rendement		Fluorescence des blancs**	
d'urine	d'eau	Adrénaline	Noradrénaline	365 m $\mu$	436 m $\mu$
40	0	15.3	19.2	41.5	53.5
20	20	46.3	48.2	20.5	46.0
10	30	64.6	66.0	9.5	16.0
0	40	100.0***	100.0***	5.0	12.5

\* Résultats d'une expérience typique sur une urine donnée.

\*\* Unités arbitraires.

\*\*\* Calculé comme 100%.

expérience typique où l'on voit que la dilution, en plus d'améliorer le rendement de la chromatographie, permet une meilleure élimination des substances fluorescentes des urines, comme le montrent les valeurs des blancs. (Nous croyons aussi que les écarts de rendement d'une urine à l'autre pourraient s'expliquer par la dilution variable des substances interférentes dans l'échantillon original.)



Dans cette expérience, le volume de la phase liquide à chromatographier était de 40 ml dans chaque cas. Si, par contre, l'on augmente le volume initial en portant l'échantillon à 200 ml, il y a une diminution considérable du rendement (comme on l'a d'ailleurs vu précédemment dans le cas des solutions dans l'eau). Ainsi, dans un essai typique, la récupération des catécholamines ajoutées est tombée de 25 à 3 % quand nous avons pris un volume initial d'urine de 200 ml (au lieu de 40 ml).

Donc, à toute fin pratique, dans le choix des conditions les meilleures, il faut retenir que (a) le volume de la phase liquide doit être faible, sinon le rendement diminue, (b) la quantité des urines doit être suffisante, de sorte qu'il existe une différence appréciable entre la fluorescence due aux catécholamines et celles de blancs de réactifs, (c) la dilution doit être la plus grande qui soit compatible avec les deux conditions précédentes.

En compromis, nous avons opté pour les conditions suivantes: un volume initial d'urine de 10 ml dilué avec 30 ml d'eau distillée, soit un volume total de 40 ml chromatographié en présence d'un gramme d'alumine. Dans ces conditions, les rendements moyens pour un grand nombre de déterminations sont de 43.5 % pour la noradrénaline et de 46.0 % pour l'adrénaline. Ce sont ces pourcentages que nous avons utilisés pour établir notre équation générale (voir plus loin).

*Suggestion d'un mode opératoire pour l'isolement des catécholamines au moyen de l'alumine*  
À la suite de l'étude décrite dans la partie expérimentale, nous suggérons le mode opératoire suivant comme offrant le plus de commodité et les meilleures garanties de précision.

(a) *Réactifs*. Solution standard d'adrénaline: Solution à 10 mg/l, acidulée; diluer 10 fois avec de l'eau acidulée avant usage (0.5 ml contient 0.5  $\mu$ g).

Solution standard de noradrénaline: Solution à 10 mg/l acidulée (0.2 ml contient 2.0  $\mu$ g).

Alumine.

Sel disodique de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA).

Phénolphthaleine à 1 % (solution alcoolique).

NaOH 0.1 N.

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 N.

NaHCO<sub>3</sub> à 2 %.

Tampon à l'acétate, pH 6: Préparer une solution d'acétate de sodium à 2 %; ajuster à pH 6 avec de l'acide acétique.

Ferricyanure de potassium à 0.25 %.

Mélange NaOH-acide ascorbique (préparer immédiatement avant usage): Peser 0.2 g d'acide ascorbique et porter à 10 ml; prendre 1 ml et mélanger à 9 ml de NaOH 5 N.

(b) *Chromatographie*. On recueille les urines des 24 h sur 5 ml d'acide sulfurique concentré. À l'arrivée au laboratoire, on ajuste le pH entre 2 et 3 avec de l'acide sulfurique et on mesure le volume total. On prélève un échantillon de 20 ml, on dissout environ 100 mg de EDTA sodique et on divise en deux portions, l'une servant

de standard "interne", et l'autre d'inconnu. À la première on ajoute 0.5  $\mu\text{g}$  d'adrénaline et 2.0  $\mu\text{g}$  de noradrénaline. À partir de ce moment, les deux échantillons sont traités de la même manière. On leur ajoute 30 ml d'eau distillée, 1 g d'alumine, quelques gouttes de phénolphthaléine à 1 % et on ajuste le pH à 8.5 au moyen d'une solution de NaOH 0.1 *N* (la soude est ajoutée jusqu'à la teinte rose pâle, puis on ajuste avec un pH-mètre). L'adsorption se fait par agitation durant quatre minutes. On laisse déposer l'alumine et on décante le liquide surnageant. On fait suivre quatre lavages avec 20 ml d'eau distillée. On centrifuge brièvement, on décante et on assèche les parois avec une tige montée d'ouate ou une pointe de papier filtre. L'éluat se fait ensuite par agitation avec 5 ml d'acide sulfurique 0.2 *N* pendant quatre minutes, suivie d'une brève centrifugation. On prélève ensuite deux portions de 1.5 ml de l'éluat du standard et deux portions de 1.5 ml de celui de l'inconnu: elles serviront à déterminer respectivement la fluorescence totale et celle des blancs des réactifs.

#### *Formation des lutines*

A chacun des quatre échantillons, on ajoute 1.5 ml de  $\text{NaHCO}_3$  à 2 %, 3 ml du tampon à l'acétate (pH 6). A un standard et à un inconnu, on ajoute 0.2 ml de ferricyanure à 0.25 %, on mélange et on laisse reposer deux minutes. On ajoute 1 ml du mélange NaOH-acide ascorbique. Pour les deux blancs restant, on inverse l'ordre de ces deux derniers réactifs, soit le mélange NaOH-acide ascorbique suivi du ferricyanure. On mesure pour les quatre échantillons la fluorescence produite par les deux sources excitatrices (raies 365  $m\mu$  et 435  $m\mu$  du mercure) par rapport à une solution de référence (une solution fraîche de 10  $\mu\text{g}$  au litre de fluorescéine tamponnée à pH 8.2 ou, mieux, un standard plus stable, comme un verre fluorescent). On obtient donc en définitive huit mesures pour chaque urine:

un standard et un blanc à 365 et à 436  $m\mu$ ;

un inconnu et un blanc à 365 et à 436  $m\mu$ .

Dans toutes nos déterminations, le blanc de l'inconnu et le blanc du standard se sont avérés identiques, ce qui justifie notre manière de mesurer le blanc et confirme l'uniformité des préparations d'alumine. Les calculs peuvent donc se simplifier comme suit: (a) La différence des lectures du standard et de l'inconnu est due aux *catécholamines ajoutées*. Elles permettent d'apprécier le rendement total de l'opération. (b) La différence des lectures de l'inconnu et du blanc est due aux *catécholamines endogènes*. Ces valeurs sont corrigées pour le rendement trouvé en (a).

#### *Équations générales*

Les équations générales servant à établir la teneur en adrénaline (*A*) et en noradrénaline (*N*) sont obtenues en faisant la moyenne d'un nombre suffisant de déterminations sur des urines additionnées de quantités connues des deux catécholamines et soumises au mode opératoire suggéré. On obtient des équations du genre suivant (ces équations ne sont offertes qu'à titre d'exemple, les coefficients varient évidemment avec l'appareil, les filtres et la solution de référence);

$F$  = unités arbitraires de fluorescence

$$A = \frac{8 F_{436} - 5 F_{365}}{356}$$

$$N = \frac{5 F_{365} - 2 F_{436}}{58.5}$$

(lectures de la solution de référence: 15 unités à 365 m $\mu$  et 80 à 435 m $\mu$ ).

On peut, après un certain nombre d'analyses, refaire la moyenne des valeurs obtenues, et corriger les coefficients des équations générales pour les écarts constatés entre les quantités de catécholamines ajoutées et la moyenne des quantités retrouvées. Toutefois, cette précaution n'est pas essentielle puisque la présence des standards "internes" assure la correction.

*Considérations additionnelles sur l'emploi de l'alumine comme agent adsorbant*

Bien que les résultats ci-haut mentionnés aient permis d'élaborer un mode opératoire satisfaisant en pratique, il restait encore des aspects non élucidés dans l'emploi de l'alumine comme agent adsorbant. Certaines observations décrites dans la littérature ont suggéré que l'alumine, soit sous sa forme solide, soit même à l'état dissous, joue le rôle, non seulement d'un adsorbant inerte, mais d'un agent chimique (ou catalytique) pouvant altérer les catécholamines. En effet, divers auteurs ont noté certaines anomalies apparentes que nous allons énumérer ici.

(1) Ainsi, la fluorescence des lutines est différente selon qu'elles sont formées dans un éluant acide qui a été ou non en contact avec l'alumine. Cette différence serait d'ailleurs non seulement quantitative, mais aussi qualitative: le rapport entre les fluorescences excitées par 365 m $\mu$  et 436 m $\mu$  n'est pas le même. Le phénomène est rapporté par PRICE ET PRICE<sup>5</sup> qui, dans la préparation des standards, spécifient que "[the] addition [of catecholamines] made to reagents which have not been exposed to alumina are unacceptable for analytic purposes because the fluorescence observed per microgram of E and NE and ratios of fluorescence observed using the 400 and 436 primary filters are modified by the presence of the acetic acid eluate of alumina". Les auteurs, cependant, n'offrent aucune tentative d'explication de ce phénomène.

(2) CROUT<sup>4</sup>, de son côté, explique le changement dans le niveau de la fluorescence totale (sans tenir compte des sources différentes de lumière excitatrice) par un effet de simple extinction ("quenching") due à la perte de lumière excitatrice par dispersion sur des microcristaux d'alumine en suspension.

(3) Enfin, JONES ET BLAKE<sup>6</sup> signalent l'anomalie suivante: quand une solution de noradrénaline, après avoir été soumise à une première chromatographie, est ramenée aux conditions initiales de volume et de pH et est rechromatographiée, le rendement de la seconde opération n'est que de 50 % de celui de la première. Les auteurs suggèrent explicitement une transformation d'une partie de la catécholamine au cours du premier contact avec l'alumine, fraction pour laquelle l'adsorbant n'aurait plus la même affinité.

Nous avons repris cette étude dans l'espoir d'y apporter quelques lumières.

(a) L'influence de l'alumine sur la fluorescence (des lutines) obtenue par excitation à diverses longueurs d'onde est illustrée au Tableau I. On y voit que le contact de l'alumine change le rapport des fluorescences obtenues par des excitations différentes, comme l'avaient signalé PRICE ET PRICE. Cependant les écarts sont relativement faibles et pourraient s'expliquer par un autre mécanisme que celui de la formation de dérivés de nature différente.

Pour confirmer l'action possible de l'alumine sur les mesures de fluorescence elle-même, nous avons ajouté des aliquotes d'une solution de fluorescéine à l'éluant acide qui avait été auparavant mis au contact de diverses alumines. Le pH des solutions fut ensuite ramené à 8 et la fluorescence mesurée pour les deux raies d'excitation mentionnées. Le Tableau V montre que les fluorescences spécifiques sont changées et que le rapport des fluorescences selon les sources d'excitation n'est plus le même

TABLEAU V  
INFLUENCE DE DIVERSES ALUMINES SUR LA  
FLUORESCENCE SPÉCIFIQUE DE LA FLUORESCÉINE À pH 8

Alumine utilisée	Fluorescence (unités art.)		Rapport de la fluorescence	Turbidité à pH 8
	365 m $\mu$	436 m $\mu$		
Fluorescéine seule	15.0	16.0	1.07	—
L-93-12	22.0	27.0	1.23	3
Brickman	25.0	31.5	1.26	6
L-93-8	29.5	38.0	1.29	11
Woelm	57.0	97.0	1.70	28

d'une alumine à l'autre. On remarquera que ce rapport augmente dans le même ordre que la solubilité des alumines (il faut souligner que l'effect est ici exagéré par la grande insolubilité de l'alumine au pH employé (soit 8) à contraster avec le pH final dans le cas des catécholamines (soit 14).

(b) L'influence que peut avoir une première adsorption sur le comportement des catécholamines lors d'une seconde adsorption sur l'alumine, a été étudiée grâce à l'adrénaline marquée (<sup>14</sup>C). Les mesures ont été effectuées à la fois par fluorimétrie et par mesure de la radioactivité, et les résultats obtenus furent les suivants: rendement de la 1ère chromatographie: 80 % par la fluorescence et 81 % par la radioactivité; rendement de la 2ième chromatographie: 59 % par la fluorescence et 56 % par la radioactivité. L'accord entre les deux résultats indique qu'il ne s'agit pas d'un abaissement de fluorescence par des substances étrangères, mais bien d'une diminution du matériel récupéré. Le Tableau VI montre qu'il y a effectivement une baisse de rendement considérable pour la plupart des alumines et aussi que cette perte se fait sentir surtout pour les alumines les plus solubles (caractérisées par une forte turbidité et une grande surface interne). L'explication du phénomène est en réalité fort simple: l'éluat acide au pH d'adsorption (8.5) laisse précipiter l'alumine dissoute sous forme

TABLEAU VI  
RENDEMENT DES CHROMATOGRAPHIES SUCCESSIVES DE LA NORADRÉNALINE  
SUR DIVERSES ALUMINES

Alumine	Rendement (%) <sup>*</sup>		Rapport de l'efficacité de la sième à la ière	Surface interne (m <sup>2</sup> /g)	Turbidité à pH 8
	ière chromatographie	sième chromatographie			
L-93-12	53.0 (53.5)	51.5 (74.0)	0.97 (1.38)	2.1	3
Brickman	50.5 (52.5)	27.0 (17.1)	0.54 (0.33)	9.1	6
L-93-8	79.0 (84.0)	45.0 (64.0)	0.57 (0.76)	23.1	11
Woelm	89.0 (100.0)	39.0 (29.0)	0.44 (0.29)	91.5	28

\* Les rendements sont calculés sur la base d'une seule mesure de fluorescence avec  $\lambda$  excitation: 365 m $\mu$ ; les chiffres entre parenthèses sont ceux calculés avec  $\lambda$  excitation: 436 m $\mu$  pour les mêmes échantillons.

d'un gel très fin (visible toutefois à l'oeil nu pour les alumines les plus solubles telles que celle de Woelm). Ce gel adsorbe une partie des catécholamines et est emporté facilement au cours des décantations et des lavages, par contraste avec l'alumine franchement cristalline qui sédimente facilement.

À notre avis, ces diverses expériences fournissent l'explication des anomalies apparentes qui ont été à la base de l'hypothèse d'une altération chimique des catécholamines.

#### REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier le docteur J. G. LINDSAY, Ph. D., (Aluminium Laboratories Limited, Arvida) qui nous a fourni les échantillons expérimentaux d'alumine et a effectué les déterminations physico-chimiques sur les diverses alumines utilisées au cours du présent travail; mesdemoiselles LOUISE VACHON, d.t.m., et MADELEINE LIZOTTE, R. T. (Bioch.) pour leur précieuse collaboration technique.

#### RÉSUMÉ

À la lumière des propriétés physico-chimiques de diverses préparations commerciales et expérimentales d'alumines, il a été possible d'élucider les conditions d'adsorption de l'adrénaline et de la noradrénaline, en vue de leur dosage chimique dans l'urine. Cette étude a permis d'élaborer un mode opératoire fiable qui, entre autres, fait usage d'un double standard "interne" pour tenir compte du comportement différent des deux catécholamines au cours de l'adsorption et au cours de la formation des lutines fluorescentes.

Enfin des expériences additionnelles ont servi à mettre sérieusement en doute l'hypothèse d'une altération chimique des catécholamines au contact de l'alumine, comme le suggéraient diverses observations d'autres chercheurs.

#### SUMMARY

The physicochemical characteristics of various commercial and experimental aluminas have been investigated: those with greater internal surface areas are more efficient

as adsorbents, but they are also more soluble during acid elution. This affects the final fluorescence of lutins qualitatively (spectrum distortion) as well as quantitatively. Although some types of alumina appear to be usable as such for routine analysis, a procedure is suggested for obtaining a uniformly reliable material.

Adsorption of catecholamines is maximal at pH 8-9. Its efficiency is decreased by increasing the volume of the liquid phase. Acid eluents differ in their behaviour; they have a direct influence on the fluorescence of lutins, and an indirect one dependent upon their solvent action on alumina. Sulphuric acid (0.2 N) is recommended as most suitable.

When the above-mentioned criteria are applied to urine, much lower yields and poorer reproducibility are encountered. One difficulty, probably due to poorly soluble phosphates, is overcome by using a chelating agent. Dilution of the urine prior to adsorption reduces the concentration of interfering material but adversely affects adsorption: optimum conditions are obtained by diluting 10 ml of sample with 30 ml of water per gram of alumina.

Since these factors do not affect adrenaline (A) and noradrenaline (N) to the same degree, a detailed procedure is described which makes use of both catecholamines as "internal" standards in amounts approximating those found in biological samples (0.5  $\mu\text{g}$  of A; 2.0  $\mu\text{g}$  of N per 10 ml of urine). These standards also provide for the different behaviour of A and N during lutin formation. Blanks of both "internal" standards and unknowns are identical when the oxidizing agent (ferricyanide) and the stabilizer (ascorbate) are reversed in order, an argument in favour of the reliability of such a procedure. Differential estimation is performed by calculating the respective contribution of A and of N to the fluorescence developed under two different activation sources, as suggested by PRICE AND PRICE.

Previous observations by some workers had suggested that catecholamines might be chemically altered by contact with alumina. Evidence is offered that such apparent anomalies are due to a purely mechanical loss of catecholamines during manipulations, especially when "soluble-type" aluminas are used.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> A. LUND, *Acta Pharmacol.*, 5 (1949) 231.
- <sup>2</sup> *Colloques nationaux du Centre de la Recherche Scientifique: L'adrénaline et la noradrénaline dans la régulation des fonctions homéostatiques*, Lyon, 1957.
- <sup>3</sup> T. L. SOURKES ET B. D. DRUJAN, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 35 (1957) 711.
- <sup>4</sup> J. R. CROUT, *Pharmacol. Rev.*, 11 (1959) 296.
- <sup>5</sup> H. L. PRICE ET M. L. PRICE, *J. Lab. Clin. Med.*, 50 (1957) 769.
- <sup>6</sup> R. T. JONES ET W. D. BLAKE, *J. Appl. Physiol.*, 12 (1958) 448.
- <sup>7</sup> I. EHRLÉN, *Farm. Revy*, 47 (1948) 242.
- <sup>8</sup> U. S. VON EULER ET I. FLODING, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 8 (1956) 288.
- <sup>9</sup> A. PEKKARINEN ET M. E. PITKÄNEN, *Scand. J. Lab. Clin. Invest.*, 7 (1955) 1.
- <sup>10</sup> J. G. LINDSAY, communication personnelle.