

CHROM. 5235

# DIE DIREKTE QUANTITATIVE AUSWERTUNG VON DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAMMEN DURCH REMISSIONS- UND FLUORESZENZMESSUNGEN

## 6. MITTEILUNG. BESTIMMUNG VON ADRENALIN, NORADRENALIN UND DOPAMIN AUS DEM HARN

H. E. GEISLER\* UND E. MUTSCHLER

*Pharmazeutisches Institut der Johannes Gutenberg-Universität, 65 Mainz, Saarstr. 21 (B.R.D.)*

(Eingegangen am 3. November 1970)

---

### SUMMARY

*Direct quantitative evaluation of thin-layer chromatograms by remission- and fluorescence measurements. Part 6. Determination of adrenaline, noradrenaline and dopamine from urine*

Adrenaline, noradrenaline and dopamine were separated from urine on aluminium oxide columns; after elution they were converted into their O<sup>3</sup>,O<sup>4</sup>,N-triacetyl derivatives and separated using thin-layer chromatography. The triacetyl derivatives were *in situ* converted to fluorescing compounds using ethylene diamine and quantitatively estimated using the Chromatogram-Spectrophotometer (Carl Zeiss, Oberkochen). The advantage of this method over the conventional fluorometric determination of catecholamines in solution lies in the fact that the individual catecholamines present on the chromatogram are separated from each other and from fluorescing impurities and can be determined without elution from the thin layer, *i.e.*, without loss. The precision is greater as compared with gas chromatographic analysis of urine. The relative standard deviation for the determination of the individual catecholamines is *ca.*  $\pm 5\%$ , the detection limit for physiological concentrations is *ca.* 75%.

---

### EINLEITUNG

Die grosse Bedeutung der quantitativen Bestimmung von Adrenalin (A), Noradrenalin (NA) und Dopamin (D) bei pharmakologischen Untersuchungen sowie in der Diagnostik geht aus den zahlreichen Publikationen hervor, die sich Jahr für Jahr mit diesem Problem befassen. Die derzeit gebräuchlichen Standardmethoden scheinen noch nicht voll zu befriedigen, da ständig Varianten zu ihrer Verbesserung

---

\* Teilergebnisse der Dissertation H. E. Geissler, in Vorbereitung.

vorgeschlagen werden. Die früher oft eingesetzten biologischen Verfahren sind zwar sehr empfindlich, andererseits aber auch sehr aufwendig. In zunehmendem Masse werden daher chemisch-physikalische Bestimmungsmethoden benutzt. Diesen ist gemeinsam, dass zunächst eine Abtrennung der Catecholamine von Begleitstoffen an Aluminiumoxid, Ionenaustauschern oder durch Extraktion erfolgt (vgl. z.B. Lit. 1-5). Bei den "klassischen Verfahren" wird anschliessend die eigentliche Messung so durchgeführt, dass man die Catecholamine nebeneinander fluorimetrisch in derselben Lösung bestimmt. Ferner besteht die Möglichkeit, durch Papier-, Dünnschicht- oder Gaschromatographie das Catecholamingemisch in die Einzelkomponenten aufzutrennen und diese isoliert zu erfassen. Die Auswertung der Papier- und Dünnschichtchromatogramme wurde bisher dadurch erschwert, dass die Substanzen nach der Trennung aus den entsprechenden Chromatogrammzonen eluiert werden mussten. Dieser Nachteil würde bei einer direkten Auswertung entfallen. In den letzten Jahren wurden z.B. von CHOULIS<sup>6</sup> mit reinen Testlösungen der Catecholamine im Mikrogrammbereich densitometrische Messungen vorgenommen. Im Nanogrammbereich führten SEILER<sup>7</sup> UND WIECHMANN mit DANS-Adrenalinlösungen direkte fluorimetrische Bestimmungen durch. Aufgrund unserer guten Erfahrungen bei der Direktauswertung von Dünnschichtchromatogrammen mittels Remissions- und Fluoreszenzmessungen<sup>8-12</sup> versuchten wir, dieses Verfahren auch für die gleichzeitige quantitative Bestimmung von Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin aus dem Harn einzusetzen. Wir erwarteten von dieser Methode eine grössere Selektivität als bei den klassischen Bestimmungsverfahren und eine höhere Genauigkeit im Vergleich zur Gaschromatographie.

## METHODIK

### *Allgemeine Beschreibung des Untersuchungsganges*

Der zur Untersuchung vorbereitete Harn wird zunächst zur Adsorption der zu bestimmenden Catecholamine A, NA und D über eine Aluminiumoxid-Säule gegeben. Die Amine werden anschliessend mit Essigsäure eluiert und mit Essigsäureanhydrid in gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung nach WELSH<sup>13</sup> zu den O<sup>3</sup>,O<sup>4</sup>, N-Triacetyl-Derivaten umgesetzt. Die Triacetyl-Verbindungen werden mit Dichlormethan ausgeschüttelt und nach dem Einengen auf eine mit Kieselgel beschichtete Dünnschichtplatte aufgetragen. Auf die gleiche Platte werden Eichlösungen mit den Triacetylverbindungen der drei Substanzen A, NA und D aufgetragen. Nach dem Entwickeln der DC-Platte wird mit einem Hexacyanoferrat(III)-Äthylendiamin-Reagens besprüht. In der Wärme entwickeln sich fluoreszierende Kondensationsprodukte, die für eine fluorimetrische Bestimmung geeignet sind. Die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Substanzflecke werden mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer (s.u.) gemessen. Die Auswertung erfolgt über eine Eichgerade aus den mitbestimmten Eichsubstanzen.

### *Geräte und Material*

Chromatogramm-Spektralphotometer (Carl Zeiss, Oberkochen) mit Servogor-Kompensations-Linienschreiber RE 511 (Metrawatt AG., Nürnberg).

Desaga-Mikrodosierspritze mit Motorantrieb (Eigenbau): Auf der Mikrometerschraube der Spritze wurde ein Rad befestigt, das über einen Keilriemen von

einem stark untersetzten Motor angetrieben wird. Die stufenlose Regelung der Drehgeschwindigkeit erfolgt über einen Schiebewiderstand. Die Kanüle ist an der Spitze schräg abgefeilt, sodass sie mit der DC-Platte etwa einen Winkel von  $30^\circ$  bildet. Dadurch kann die Lösung einerseits ungehindert ausfließen, andererseits wird bereits bei leichtem Kontakt mit der DC-Platte das "Hochkriegen" der Lösung an der Kanüle verhindert.

DC-Platten "Merck" ohne Fluoreszenzindikator ( $20 \times 20$  cm).

Multifix-Motorpumpe mit einem Desaga-DC-Sprüher.

*Substanzen.* Aceton, Dichlormethan, EDTA-Dinatriumsalz, Essigsäure, Essigsäureanhydrid, Kaliumhexacyanoferrat(III), Kaliumnatriumtartrat, Methanol, Natriumacetat, Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Natriumsulfat sicc., Natriumsulfit (sämtlich p.A. "Merck").

Aluminiumoxid: Aluminiumoxid neutral "Woelm" wird in einer Säule mit Glassinterplatte mit  $1 N$  HCl und anschliessend bis zur neutralen Reaktion mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen bei  $150^\circ$  wird das Aluminiumoxid gesiebt. Die Siebfraction mit der Teilchengrösse  $100-150 \mu\text{m}$  wird für die Bestimmung verwendet.

Äthylendiamin: Äthylendiamin techn. ca. 97% wird destilliert und verschlossen unter Lichtschutz aufbewahrt.

Natriumacetat-Natriumsulfit-EDTA-Lösung: 27.2 g (0.2 Mol) Natriumacetat  $\cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g Natriumsulfit und 1 g EDTA-Dinatriumsalz werden in 1000 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird mit 0.5 M Natriumcarbonat-Lösung gegen Phenolphthalein auf einen pH-Wert von 8-9 gebracht. Sie ist nur eine Woche haltbar.

Catecholamin-Stammlösung: 16.88 mg Adrenalinbitartrat\*, 17.47 mg Noradrenalinbitartrat\*, und 49.52 mg Dopaminhydrochlorid werden mit  $100 \mu\text{l}$   $1 N$  HCl versetzt, mit Wasser auf 100.0 ml aufgefüllt und im Eisschrank bei  $+4^\circ$  aufbewahrt. Die Lösung ist mindestens 2-3 Wochen stabil. Vergleichslösung der Triacetyl-Verbindungen: 1.00 ml Catecholamin-Stammlösung wird mit 9 ml Wasser, 2.0 g Natriumhydrogencarbonat und 1 ml Essigsäureanhydrid versetzt, 5 mal mit je 10 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und über 10 g Natriumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wird 2 mal mit je 10 ml Dichlormethan nachgewaschen, anschliessend werden die vereinigten Dichlormethanauszüge im Wasserbad bei ca.  $50^\circ$  eingedampft. Dieser Vorgang wird insgesamt 3 mal ausgeführt. Die 3 Rückstände werden in Dichlormethan gelöst, vereinigt und bei  $20^\circ$  auf 100.0 ml aufgefüllt.  $10 \mu\text{l}$  dieser Lösung enthalten 120 ng D, 30 ng NA und 30 ng A. Die Vergleichslösung wird in Portionen von etwa 1 ml in der Tiefkühltruhe aufbewahrt. Innerhalb eines Monats konnte bei den Vergleichslösungen keine Gehaltsminderung festgestellt werden.

### Vorbereitung des Harns

Der Harn wird mit 0.1% EDTA-Dinatriumsalz und 0.05% Natriumsulfit versetzt und 30 Min. bei 5000 UpM zentrifugiert. 5.0 ml Harn (bei Harnen mit geringerer Dichte 10 ml) werden mit 10 ml Natriumacetat-Natriumsulfit-EDTA-Lösung, 1 Tropfen 1%iger äthanolischer Phenolphthalein-Lösung und 0.5 M Natriumcarbonat-Lösung bis zum Umschlag des Indikators versetzt.

\* Wir danken den Farbwerken Hoechst AG für die Bereitstellung der Testsubstanzen.

### *Vortrennung der Catecholamine*

Sofort nach dem Alkalisieren werden die Catecholamine an einer Aluminiumoxid-Säule adsorbiert. Dazu dient eine 25 cm lange Glassäule mit einem inneren Durchmesser von 5 mm, die oben einen Glockentrichter von etwa 50 ml besitzt und am unteren Ende zu einer Spitze ausgezogen ist<sup>14</sup>. In die Spitze wird etwas Glaswolle gebracht, auf die 0.7 g Aluminiumoxid trocken aufgeschichtet werden. 5 bis 10 ml Natriumacetat-Natriumsulfit-EDTA-Lösung werden in die Säule aufgesaugt. Nach dem Abtropfen der Lösung wird der präparierte Harn über die Säule gegeben und die Säule danach mit 5 ml einer Lösung nachgewaschen, die 0.01% EDTA-Dinatriumsalz und 0.005% Natriumsulfit enthält und mit Natriumcarbonat bis zum Umschlagspunkt von Phenolphthalein alkalisiert wurde. Sofort danach werden die Catecholamine mit 10.0 ml 1 M Essigsäure von der Säule eluiert.

### *Acetylierung*

Das essigsäure Eluat wird in einem 50 ml Erlenmeyerkölbchen mit 1 Tropfen 1 M Kaliumnatriumtartrat-Lösung versetzt. Anschliessend werden in kleinen Anteilen 2.7 g Natriumhydrogencarbonat und 1.0 ml Essigsäureanhydrid zugefügt. Gegen Ende der Reaktion muss eventuell etwas erwärmt werden, damit das Natriumhydrogencarbonat vollständig in Lösung geht. Wenn kein CO<sub>2</sub> mehr entweicht, wird 5 mal mit je 10 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und über 10 g Natriumsulfat getrocknet. Das Natriumsulfat wird 2 mal mit je 10 ml Dichlormethan nachgewaschen. Die vereinigten Dichlormethan-Auszüge werden im Wasserbad bei etwa 50° eingengt. Die eingengte Lösung wird in einem 15 ml fassenden Glas, das an einer unten angebrachten, auf etwa 4 mm verjüngten Spitze eine 500- $\mu$ l Marke besitzt, im Wasserbad bis zur Trockne eingedampft. Die Gefässwand wird 2 bis 3 mal mit Dichlormethan nachgespült. Der eingedampfte Rückstand wird schliesslich mit Dichlormethan bei etwa 20° bis zur Marke aufgefüllt.

### *Chromatographie und Fluoreszenzreaktion*

Für die Ermittlung der Eichgeraden werden 2 verschiedene Catecholamin-Konzentrationen auf je 3 Startpunkten aufgetragen. Aliquote Teile der Untersuchungslösung trägt man daneben auf 3 Startpunkte auf. Beispiel: 3 mal 10  $\mu$ l Vergleichslösung (= je 120 ng D, 30 ng A und 30 ng NA), 3 mal 30  $\mu$ l Vergleichslösung (= je 360 ng D, 120 ng A und 120 ng NA) und 3 mal 50  $\mu$ l Untersuchungslösung. Die Chromatographie erfolgt auf Kieselgel-Fertigplatten ohne Fluoreszenzindikator "Merck" unter Standardbedingungen<sup>15</sup>. Laufstrecke = 16 cm.

Fliessmittel: Aceton-Dichlormethan-Essigsäure (20:80:4). Nach dem Entwickeln wird die DC-Platte 5 Min. an der Luft getrocknet und anschliessend mit einem Reagens aus 80 ml Methanol, 20 ml Äthylendiamin und 20 ml 0.5%iger wässriger Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung besprüht. (Das Reagens wird jeweils frisch bereitet. Das Methanol wird mit dem Äthylendiamin vermischt, dann erst wird die Hexacyanoferrat-Lösung zugegeben.)

Das Reagens wird mit Pressluft durch einen DC-Sprüher sehr fein zerstäubt und aus einem Abstand von 10–20 cm aufgesprüht, bis die Sorptionsschicht gleichmässig durchfeuchtet ist. Die Kondensationsreaktion erfolgt während 30 Min. bei 65° im Trockenschrank.

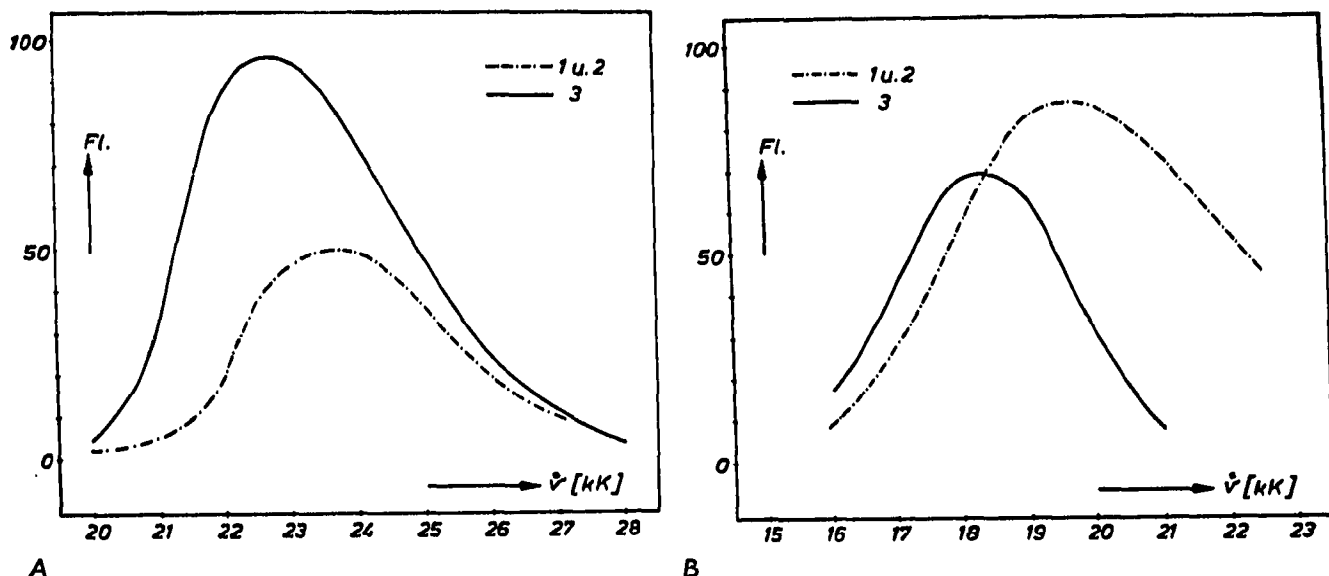


Fig. 1. Unkorrigierte, auf den Untergrund der DC-Platte bezogene Exzitationsspektren (A) und Emissionsspektren (B) der Triacetyl-Derivate von Adrenalin (1), Noradrenalin (2) und Dopamin (3) mit Äthylendiamin. Fl. = Fluoreszenzintensität;  $\nu$  = Wellenzahl [ $\text{cm}^{-1}$ ] angegeben in kK = Kilokayser. Die Exzitationsspektren wurden mit Hilfe einer Xenon-Lampe LX 501 (Zeiss) mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer aufgenommen. Monochromatorspalt, 0,1 mm; Sperrfilter FL 56. Bei der Aufnahme der Emissionsspektren wurde mit der Hg-Linie 24,69 kK = 405 nm angeregt; Monochromatorspalt 0,8 mm.

$R_F$ -Werte der Triacetyl-Derivate sind: D = 0,46; A = 0,35; NA = 0,22. Vor der Messung bleiben die Platten etwa 15 Min. zur Äquilibration im Messraum.

*Messung und Auswertung*

Zur Fluoreszenzmessung wird ein Chromatogrammleck durch monochromatisches Licht möglichst im Exzitationsmaximum angeregt und die Intensität der Emissionsstrahlung durch einen Photoelektronenvervielfacher gemessen. In Fig. 1 sind die Exzitations- und Emissionsspektren der nach dem oben beschriebenen Verfahren

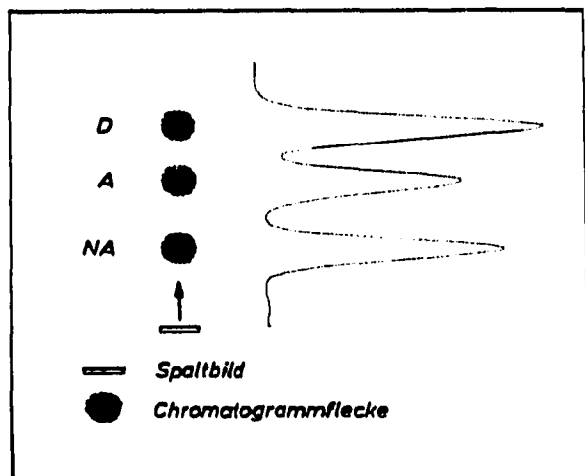


Fig. 2. Fluoreszenzintensitäts-Ortskurven von Adrenalin (A), Noradrenalin (NA) und Dopamin (D). Die Aufnahme erfolgte mittels eines Spaltes.

erhaltenen Kondensationsprodukte der O<sup>3</sup>,O<sup>4</sup>, N-Triacetyl-Derivate von Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin mit Äthylendiamin dargestellt.

Die Messfläche auf den Chromatogrammen kann entweder durch Veränderung einer Kreisblende oder des Monochromatorspaltes variiert werden. Die Länge des Spaltbildes des Monochromatorspaltes wird durch Einsteckblenden begrenzt. Wir verwendeten bei unseren Messungen ein Spaltbild von 6 mm Länge. Zur Fluoreszenz-Anregung verwendeten wir die Hg-Mitteldrucklampe St. 41 und zur Messung des Fluoreszenzlichtes den Sekundärelektronenvervielfacher 1P28 der RCA.

Bei der Messung wird das Chromatogramm durch den Motorantrieb des Kreuztisches so bewegt, dass die einzelnen Flecke nacheinander in Laufrichtung des Chromatogramms von dem Spaltbild (oder der durch die Kreisblende begrenzten Kreisfläche) erfasst werden. Der Schreiber zeichnet in Abhängigkeit vom Ort Fluoreszenzintensitäts-Ortskurven auf (Fig. 2).

Bei der Messung mit der Kreisblende gibt die Peakhöhe der zugehörigen Kurve die gesamte Fluoreszenzintensität eines Fleckes wieder. Bei der Messung mit dem Spalt, die eine grössere Empfindlichkeit gewährleistet, stellt die von der Kurve umschlossene Fläche (errechnet aus Halbwertsbreite mal Höhe) ein Mass für die Fluoreszenzintensität des gesamten Fleckes dar. Bei gleichmässig entwickelten Chromatogrammen genügt es, lediglich das Peakmaximum zu bestimmen, das der Fluoreszenzintensität eines durch den Fleckmittelpunkt gehenden spaltförmigen Segmentes entspricht. Wir erhielten auf diese Weise genauere Ergebnisse als durch die Integration, da sich bei den in der Praxis vorkommenden Kurven die Peakhöhe fehlerloser feststellen lässt als die von einer Kurve umschlossene Fläche.

Aufnahmebedingungen: Durchlässigkeit des Monochromators für Emissionslicht der Wellenzahl 22.2 kK (= 495 nm); Spaltbild, 0.8 × 6 mm; Anregung mit der durch den Monochromatfilter ausgesonderten Hg-Linie 24.69 kK (= 405 nm); Tischvorschub Stufe 3 (= 30 mm/Min.); Vorschub des Schreibers 30 mm/Min.; Verstärkung, je nach Fluoreszenzintensität des substanzreichsten Flecks, zwischen 10/2/II/A und 10/7/II/A.

Durch Auswertung der Testflecke erhält man für jede der zu bestimmenden Substanzen 2 aus je 3 Bestimmungen gemittelte Messpunkte zur Aufstellung der Eichgeraden. Zwei Kurvenpunkte genügen hierfür, da zwischen der Substanzmenge und der Fluoreszenzintensität über 3 Zehnerpotenzen Linearität besteht.

## ERGEBNISSE

Der Messwert für eine bestimmte Menge eines Catecholamins ändert sich durch Veränderung der Konzentrationen der anderen Catecholamine nicht. Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate und der Reproduzierbarkeit der Bestimmungen wurde eine grössere Harnmenge durch Passage über zwei Aluminiumoxidsäulen zunächst von den natürlich vorhandenen Catecholaminen befreit. Dann wurden pro 0.5 ml Harn 50 ng NA, 50 ng A und 200 ng D zugefügt und 10 Bestimmungen ausgeführt (Tabelle I). Die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde ausserdem mit 6 Harnproben vorgenommen, die pro 0.5 ml Harn 10 ng NA, 10 ng A und 40 ng D enthielten. Diese Proben zeigten innerhalb der Fehlergrenze die gleiche prozentuale Wiederfindungsrate. Die Prüfung auf Reproduzierbarkeit der Catecholaminbestimmungen in unvorbehandelten Harnproben führte zu gleichen Ergebnissen.

TABELLE I

WIEDERFINDUNGSRATE UND REPRODUZIERBARKEIT DER CATECHOLAMIN-BESTIMMUNG AUS DEM HARN  
Catecholaminmenge pro 0.5 ml: NA und A je 50 ng; D 200 ng.

No. der Bestim- mung	Wiedergefundene Catecholaminmenge						Abweichung vom Mittelwert (%)		
	ng			%			NA	A	D
	NA	A	D	NA	A	D			
1	36.5	39.3	135	73.0	78.6	67.5	-1.6	+3.7	-5.2
2	37.3	35.5	146	74.6	71.0	73.0	+0.2	-3.9	+0.3
3	38.0	40.7	151	76.0	81.4	75.5	+1.4	+6.5	+2.8
4	37.0	36.5	138	74.0	73.0	69.0	-0.6	-1.9	-3.7
5	37.5	36.5	143	75.0	73.0	71.5	+0.4	-1.9	-1.2
6	36.5	35.0	139	73.0	70.0	69.5	-1.6	-4.9	-3.2
7	38.8	38.0	162	77.6	76.0	81.0	+3.0	-1.1	+8.3
8	37.0	38.5	152	74.0	77.0	76.0	-0.6	+2.1	+3.3
9	39.5	38.5	152	79.0	77.0	76.0	+4.4	-2.1	+3.3
10	34.7	36.0	136	69.4	72.0	68.0	-5.2	-2.9	-4.7
Mittelwerte	37.28	37.45	145.4	74.56	74.90	72.70	± 1.9	± 3.1	± 3.6
Standardabweichung	± 1.3	± 1.8	± 2.1						
Rel. Standardab- weichung				± 3.6	± 4.8	± 6.1			

## DISKUSSION

Bei den herkömmlichen fluorimetrischen Verfahren zur Bestimmung der Catecholamine erfolgt die Differenzierung zwischen den einzelnen Catecholaminen und fluoreszierenden Begleitstoffen im wesentlichen durch: Oxidation bei verschiedenem pH; Fluoreszenzmessung nach verschiedener Reaktionszeit; Ausnutzung der unterschiedlichen Exzitations- und Emissionsspektren; unterschiedliche Stabilisierung der fluoreszierenden Produkte; oder durch papierchromatographische Trennung und Bestimmung nach der Elution.

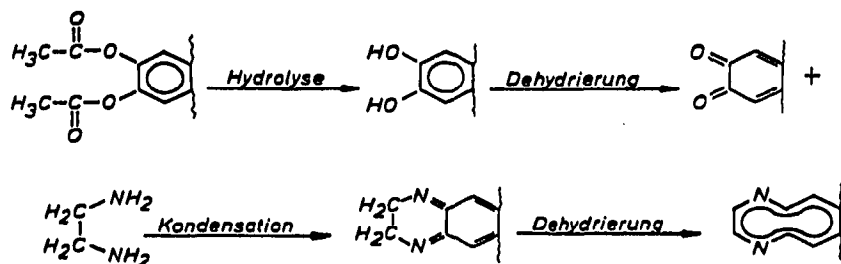
Der Vorteil des hier verwendeten Verfahrens gegenüber den "klassischen" fluorimetrischen Methoden besteht darin, dass die einzelnen Catecholamine auf dem Chromatogramm getrennt voneinander und getrennt von fluoreszierenden Begleitstoffen vorliegen und ohne Elution aus der Sorptionsschicht—somit verlustfrei—direkt bestimmt werden können. Die schwache Untergrundfluoreszenz der Dünnschicht-Platten stört nicht, da sie bei der Fluoreszenzmessung der Chromatogramme über Fluoreszenzintensitäts-Ortskurven als gerade Basislinie auftritt, auf die sich der durch die Fluoreszenz des jeweiligen Catecholamins hervorgerufene Peak überlagert.

Die Aufbereitung des Harns vor der eigentlichen Messung erfolgte nach bekannten Methoden, die geringfügig modifiziert wurden. Der frische Harn wird mit EDTA und Sulfit versetzt, um die Bildung eines gelatinösen Niederschlages von Calcium-Magnesium-Phosphat zu verhindern<sup>3</sup> und die Catecholamine vor der Oxidation zu schützen<sup>16,17</sup>. Die Vortrennung von A, NA und D von anderen Harnbestandteilen erfolgt an einer Aluminiumoxidsäule<sup>14</sup>. Bei diesem Schritt treten hauptsächlich die Verluste des Verfahrens auf. Wegen ihrer leichten Oxidierbarkeit und

ihrer starken Hydrophilie sind die Catecholamine aus einer wässrigen Untersuchungsflüssigkeit nur schwer quantitativ auf einen eng begrenzten Startfleck einer DC-Platte zu konzentrieren. Beide Probleme werden durch die Acetylierung der Catecholamine<sup>13</sup> gelöst. Die O<sup>3</sup>,O<sup>4</sup>, N-Triacetyl-Verbindungen sind einmal gegenüber oxidativen Einflüssen stabiler und zum anderen in organischen Lösungsmitteln (wie z.B. Dichlormethan) gut löslich.

GOLDSTEIN *et al.*<sup>5</sup> trennten 1959 die aus dem Harn ausgeschüttelten Triacetate auf Papier und setzten sie nach der Elution zu fluoreszierenden Produkten um. In einer Lösung, die neben den Catecholaminen Natriumacetat, Natriumhydrogencarbonat und Essigsäureanhydrid in geeigneten Konzentrationen enthält, führt die Acetylierung quantitativ zu den O<sup>3</sup>,O<sup>4</sup>,N-Triacetyl-Verbindungen. WELSH<sup>13</sup> fordert die Abwesenheit von Bisulfit, da es katalytisch eine beschleunigte Zersetzung des Anhydrids hervorruft. Wir können diese Störung der Reaktion durch Sulfit bestätigen. Bei Anwesenheit von 0.1% Natriumsulfit führte die sonst eindeutig verlaufende Reaktion mit A, NA und D zu vier statt drei Reaktionsprodukten. Geringe Mengen von Sulfit, die durch das Nachwaschen der Aluminiumoxidsäule vor der Elution mit einer 0.005% Natriumsulfit enthaltenden Lösung in das Reaktionsgemisch gelangen, rufen diese Störung jedoch nicht hervor.

Nach der chromatographischen Trennung werden die Triacetyl-Derivate mit einer wässrig-methanolischen Lösung von Kaliumhexacyanoferrat(III) und Äthylendiamin besprüht. Ein ähnliches Sprühreagens haben SCHNEIDER UND GILLIS<sup>18</sup> zur Detektion der Catecholamine eingesetzt. NATELSON *et al.*<sup>19</sup> hatten entdeckt, dass Adrenalin und Noradrenalin mit Äthylendiamin fluoreszierende Produkte bilden, die sich für eine quantitative Bestimmung verwenden lassen. Diese Methode wurde besonders von WEIL-MALHERBE ausgearbeitet<sup>20</sup>. Die Reaktion lässt sich auch mit Dopamin ausführen. Sie beruht im wesentlichen darauf, dass die Catecholamine als *o*-Diphenole leicht oxidativ in die *o*-Chinone überführt werden, die dann mit Äthylendiamin unter Ringschluss kondensieren. Der neugebildete Ring wird durch weitere Dehydrierung aromatisch<sup>21</sup>. Es ist anzunehmen, dass die Triacetyl-Verbindungen nach einer im Alkalischen zumindest an den beiden phenolischen Gruppen stattfindenden Desacetylierung vergleichbar reagieren.



Die entstandenen fluoreszierenden Stoffe können noch Stunden nach der Reaktion bestimmt werden. Bei längerer Aufbewahrung wird die Fluoreszenzintensität niedriger, was sich in einer verringerten Steigung der Eichgeraden äussert.

DANK

Fräulein MONIKA BIND danken wir für die mit Sorgfalt und Geduld ausgeführten Arbeiten.



Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für Sachunterstützung zu Dank verpflichtet.

## ZUSAMMENFASSUNG

Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin wurden aus Harn an Aluminiumoxid-Säulen adsorbiert, nach der Elution zu den O<sup>3</sup>,O<sup>4</sup>,N-Triacetyl-Derivaten umgesetzt und dünneschichtchromatographisch getrennt. Die Triacetylverbindungen wurden auf der Dünnschicht-Platte mit Äthylendiamin zu fluoreszierenden Produkten kondensiert und mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer (Carl Zeiss, Oberkochen) direkt quantitativ bestimmt. Der Vorteil dieses Verfahrens gegenüber den herkömmlichen fluorimetrischen Bestimmungen der Catecholamine aus derselben Lösung besteht darin, dass die einzelnen Catecholamine auf dem Chromatogramm getrennt voneinander und getrennt von fluoreszierenden Begleitstoffen vorliegen und ohne Elution aus der Sorptionsschicht, d.h. verlustlos, bestimmt werden können. Gegenüber gaschromatographischen Bestimmungsmethoden aus dem Harn ist die Genauigkeit grösser. Die relative Standardabweichung für die Bestimmung der einzelnen Catecholamine liegt bei  $\pm 5\%$ , die Wiederfindungsrate bei physiologischen Konzentrationen um 75%.

## LITERATUR

- 1 Å. BERTLER, A. CARLSSON UND E. ROSENGREN, *Acta Physiol. Scand.*, 44 (1958) 273.
- 2 G. L. MATTOK, D. L. WILSON UND R. A. HEACOCK, *Clin. Chim. Acta*, 14 (1966) 99.
- 3 J. R. CROUT, in D. SELIGSON (Editor), *Standard Methods of Clinical Chemistry*, Vol. 3, Academic Press, New York, 1961, p. 62.
- 4 P. A. SHORE UND J. S. OLIN, *J. Pharmacol.*, 122 (1958) 295.
- 5 M. GOLDSTEIN, A. J. FRIEDHOFF UND C. SIMMONS, *Experientia*, 15 (1959) 80.
- 6 N. H. CHOULIS, *J. Pharm. Sci.*, 56 (1967) 196.
- 7 N. SEILER UND M. WIECHMANN, *Z. Anal. Chem.*, 220 (1966) 109.
- 8 W. SCHUNACK, E. EICH, E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMMEYER, *Arzneim.-Forsch.*, 19 (1969) 1756.
- 9 E. EICH, H. GEISSLER, E. MUTSCHLER UND W. SCHUNACK, *Arzneim.-Forsch.*, 19 (1969) 1895.
- 10 K. RÖDER, E. EICH UND E. MUTSCHLER, *Arch. Pharm.*, im Druck.
- 11 E. EICH, W. SCHUNACK, E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMMEYER, *Arch. Pharm.*, im Druck.
- 12 K. RÖDER, E. EICH UND E. MUTSCHLER, *Pharm. Ztg.*, 40 (1970) 1430.
- 13 L. H. WELSH, *J. Amer. Pharm. Ass.*, 44 (1955) 507.
- 14 J. KÄGI, M. BURGER UND K. GIGER, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 230 (1957) 470.
- 15 E. STAHL, *Z. Anal. Chem.*, 234 (1968) 1.
- 16 C. HONIG, *Pharm. Weekbl.*, 89 (1954) 840.
- 17 H. W. DIBBERN UND H. FICHER, *Arzneim.-Forsch.*, 11 (1961) 317.
- 18 F. H. SCHNEIDER UND C. N. GILLIS, *Biochem. Pharmacol.*, 14 (1965) 623.
- 19 S. NATELSON, J. K. LUGOVOY UND J. B. PINCUS, *Arch. Biochem.*, 23 (1949) 157.
- 20 H. WEIL-MALHERBE, *Pharmacol. Rev.*, 11 (1959) 278.
- 21 J. HARLEY-MASON UND A. H. LAIRD, *Biochem. J.*, 69 (1958) 59P.