

CHROM. 8937

Note

Hochdruck-Flüssigkeits-chromatographische Analyse der Katecholamine Dopamin und Noradrenalin als Fluorescaminderivate

G. SCHWEDT

Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund, Ardeystr. 67, D-46 Dortmund (B.R.D.)*
(Eingegangen am 6. Oktober 1975; geänderte Fassung eingegangen am 26. November 1975)

Die Katecholamine Dopamin und Noradrenalin lassen sich mit dem Reagenz Fluorescamin zu fluoreszierenden Verbindungen umsetzen, deren Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie (DC) von Imai *et al.*¹ und Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) ebenfalls von Imai² beschrieben wurde. Bei der HPLC-Methode ist die geringste mit einem Fluorimeter bestimmbare Menge an Amin mit etwa 10 ng (= 60 pMol) angegeben, als Trennmaterial diente ein spezielles Gel.

Von den Reaktionsbedingungen sind bisher nur die Einflüsse des pH-Wertes und verschiedener Puffer systematisch untersucht worden². Das Ziel dieser Arbeit war, die DC-Methode auf die HPLC zu übertragen und die einzelnen Reaktionsparameter im Hinblick auf eine grösstmögliche Empfindlichkeit der Methode zu optimieren.

EXPERIMENTELLES

Die folgenden Geräte wurden verwendet: Varian Aerograph 4000 Flüssigkeits-Chromatograph, DuPont 836 Fluorescence Detector, 8- μ l Quarzküvette (Excitation Filter 325-385 nm, Emission Filter 451 nm); 25-cm Stahlsäule (I.D. 2 mm), gefüllt mit LiChrosorb Si 60-10 (10 μ m, Fertigsäule der Fa. Varian (Darmstadt, B.R.D.) "Micropak SI-10"); Aminco-Bowman Spectrophotofluorometer.

Chemikalien: alle organischen Lösungsmittel z.A. (E. Merck, Darmstadt, B.R.D.), Fluram (= Fluorescamin; Serva, Heidelberg, B.R.D.). Eisessig (100%), Natriumchlorid, Dinatriumhydrogenphosphat, Tris(hydroxymethyl)aminomethan, alle z.A. (Merck); Dopamin- und Noradrenalin-Hydrochlorid (= 3-hydroxytyramine hydrochloride und DL-arterenol hydrochloride, B grade-Calbiochem, Luzern, Schweiz).

Lösungen: 0.1 M Phosphatpuffer (pH 8.0); 0.05 M Trispuffer (pH 8.0); 0.1 N Salzsäure; Fluorescaminlösung, 0.2 mg/ml Aceton.

Methodik

Für die DC-Trennung der Katecholamine als Fluorescaminderivate setzten Imai *et al.*¹ als Fliessmittel ein Gemisch aus Benzol, Dioxan und Essigsäure (90:25:5)

* Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Rutenfranz.

ein. Ausgehend von dieser Zusammensetzung wurde mit einer Kieselgel-Säule (10 μm -Teilchen) die HPLC-Trennung optimiert. Das Ziel war, eine gute Auftrennung mit einer grösstmöglichen Empfindlichkeit (d.h. Peakhöhe) zu kombinieren. Für das Produkt aus der Auftrennung R und der Peakhöhe h sollte ein Maximum in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der mobilen Phase ermittelt werden.

Bei den Untersuchungen zur Optimierung der Umsetzung mit Fluorescamin wurden folgende Einflüsse berücksichtigt: Reaktionstemperatur, Gehalt an Aceton im Reaktionsgemisch, Fluorescaminüberschuss, Extrahierbarkeit mit organischen Lösungsmitteln, Stabilität der Fluorophore.

Analysenvorschrift

0.2 ml Probelösung (bis zu 1 μg Amin) werden mit 0.3 ml 0.1 M Phosphatpuffer (pH 8.0), 0.3 ml Fluorescaminlösung (0.2 mg/ml Aceton) und 0.2 ml bidest. Wasser gemischt. Nach der Sättigung mit Natriumchlorid erfolgt die Extraktion mit 0.5 ml Essigsäureäthylester (Schütteldauer eine Minute). Jeweils 50 μl der 0.8 ml umfassenden organischen Phase (Aceton wird quantitativ mitextrahiert) werden zur HPLC auf die Säule gegeben. HPLC-Bedingungen: siehe Fig. 2.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Eine Erhöhung des Anteils an Essigsäure im Elutionsgemisch Benzol-Dioxan-Essigsäure verschlechtert die Auftrennung von Noradrenalin und Dopamin als Fluorescaminderivate, jedoch sind 2% Essigsäure erforderlich, um symmetrische Peakformen zu erhalten. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung der mobilen Phase und der Reaktionsbedingungen treten nämlich bei Noradrenalin zwei Peaks unterschiedlicher Grösse auf, für deren Auftrennung dieser Anteil an Essigsäure erforderlich ist.

Die Erhöhung des Dioxangehaltes verringert die Auftrennung der Hauptkomponenten von Noradrenalin und Dopamin, erhöht jedoch die Empfindlichkeit. Für das Produkt aus der Auftrennung R und der Peakhöhe h ergibt sich in Abhängigkeit vom Dioxangehalt bei 22% ein Maximum (Fig. 1).

Bei der DC an Kieselgel¹ und der HPLC an den Hitachi 3011 und 3010-OH Gelen² wurde für Noradrenalin von Imai *et al.* jeweils nur ein Reaktionsprodukt erhalten. Eine Erklärung für das Auftreten eines zweiten Peaks kann bisher nicht gegeben werden.

Reaktionsbedingungen

Die Reaktionsbedingungen lassen sich so optimieren, dass der zweite Peak für Noradrenalin im Verhältnis zum Hauptpeak möglichst klein bleibt und so die Möglichkeiten der quantitativen Analyse kaum beeinträchtigt (Fig. 2).

Der Acetongehalt in der Reaktionslösung muss 30–40% betragen, Fluorescamin mindestens in 40-fachem molaren Überschuss vorliegen (Fig. 3a und b).

Die Reaktionstemperatur wurde von Imai *et al.* in der ersten Arbeit¹ mit 4° angegeben. Umsetzungen bei 4, 15, 25 und 40° haben keine signifikanten Unterschiede in den Peakhöhen ergeben.

Der Einfluss des pH-Wertes und die Unterschiede zwischen Phosphat- und

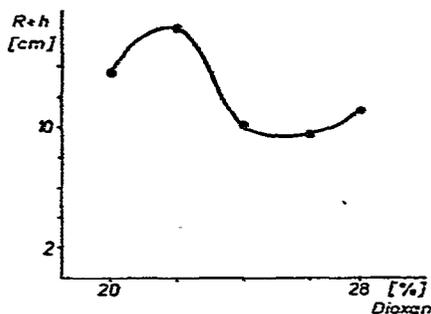


Fig. 1. Optimierung des Elutionsgemisches: Abhängigkeit des Produktes aus Auftrennung (R) und Peakhöhe (h) vom Dioxangehalt.

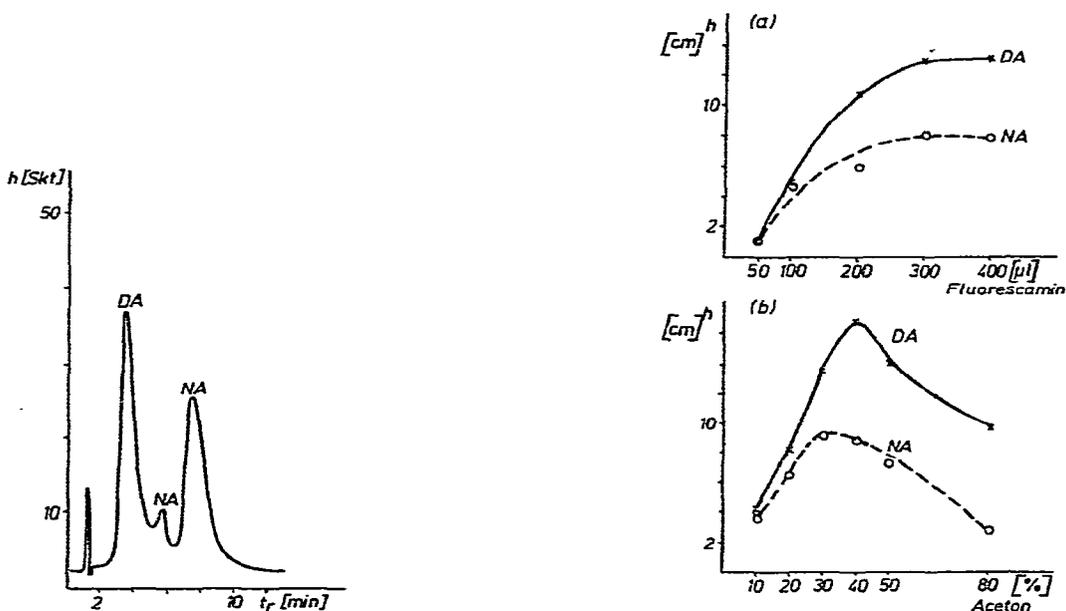


Fig. 2. Säule, Fertigsäule Micropak SI-10, 25 cm \times 2 mm I.D., gefüllt mit Kieselgel LiChrosorb SI 60-10, (10 μ m); Druck, 50 bar; Temperatur, 22°; Mobile Phase, Benzol-Dioxan-Essigsäure (76:22:2); Durchfluss, 0.50 ml/min; Probenmenge, 50 μ l (1 μ g/ml Amin); Detektor, DuPont Fluorescence Detector 836, 8 μ l Quarzküvette, (Excitation Filter 325–385 nm, Emission 451 nm).

Fig. 3. (a) Abhängigkeit der Umsetzung (= Peakhöhe) von der Fluorescaminmenge, (b) Abhängigkeit der Umsetzung vom Acetongehalt des Reaktionsgemisches (je 1 μ g Amin umgesetzt).

Boratpuffer wurden bereits von Imai² festgestellt. Aufgrund der komplexierenden Wirkung der Borationen werden nur geringe Fluoreszenzintensitäten gemessen. Verwendet man einen Trispuffer (pH 8.0), so tritt in der wässrigen Phase eine mit der im Phosphatpuffer vergleichbare Fluoreszenz auf. Jedoch lassen sich aus dem Trispuffer die Fluoreszenzprodukte mit Essigsäureäthylester nicht extrahieren, was vermutlich auf eine Wechselwirkung zwischen den Fluorophoren und den Pufferionen oder -molekülen zurückzuführen ist.

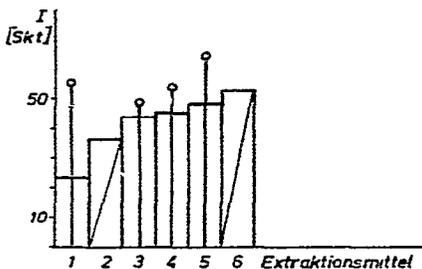


Fig. 4. Extrahierbarkeit der Fluorescaminderivate (am Beispiel des Noradrenalins). Rechteck, Messung in der Küvette; O, Peakhöhe der HPLC-Analyse; Diagonale, kein Peak in der HPLC-Analyse; Extraktionsmittel: 1, Methyläthylketon; 2, *n*-Butanol; 3, Methyl-*n*-propylketon; 4, Diisopropyläther; 5, Essigsäureäthylester; 6, Isobutanol.

Für die HPLC-Analyse empfiehlt es sich wegen des organischen Elutionsgemisches, die wässrig-acetonische Lösung nicht direkt einzuspritzen, sondern die fluoreszierenden Verbindungen vorher mit einem organischen Lösungsmittel zu extrahieren, wodurch ausserdem eine Anreicherung möglich ist.

Die Messungen zur Extrahierbarkeit der Fluorophore wurden zuerst in Küvetten mit einem Spectrophotofluorometer am Beispiel des Noradrenalins durchgeführt (Anregung: 390 nm, Fluoreszenz: 490 nm). In Isobutanol und Essigsäureäthylester erhält man die höchsten Fluoreszenzintensitäten (Fig. 4), wobei die wässrige Phase mit Natriumchlorid gesättigt werden muss. Werden diese Extraktionslösungen jedoch auf die Säule gegeben, so finden sich in Iso- und *n*-Butanol keine Noradrenalin- bzw. Dopamin-Fluorescamin-Produkte. Dagegen ist der Blindpeak in diesen Lösungen um das 2–3-fache gegenüber der Blindlösung höher. Eine Auftrennung dieser Peaks an Kieselgel war nicht möglich. Wie die Fig. 4 zeigt, erzielt man für die HPLC-Analyse mit Essigsäureäthylester die besten Ergebnisse.

Bei der Extraktion mit Methyläthylketon wird in der Küvette ein relativ hoher Blindwert gemessen. Die Differenz zwischen Probenmesswert und Blindwert ist im Vergleich zu den Peakhöhen der HPLC-Analyse gering (Fig. 4). Möglicherweise spielen hierbei Quencheffekte oder Verunreinigungen im Lösungsmittel eine Rolle. Die Fluoreszenzintensitäten der Fluorescaminprodukte sind in Essigsäureäthylester und auch in der wässrigen Phase etwa 20 min annähernd stabil, nach zwei Stunden haben sie um etwa ein Drittel abgenommen. Die Bestimmungsgrenze liegt bei etwa 200–500 pg je Einspritzung und Amin.

LITERATUR

- 1 K. Imai, P. Böhlen, S. Stein und S. Udenfriend, *Arch. Biochem. Biophys.*, 161 (1974) 161.
- 2 K. Imai, *J. Chromatogr.*, 105 (1975) 135.