

Journal of Chromatography, 143 (1977) 463—471

Biomedical Applications

©Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 050

TRENNUNG UND FLUORIMETRISCHE BESTIMMUNG VON ADRENALIN UND NORADRENALIN

KOPPLUNG EINES HOCHDRUCK-FLÜSSIGKEITS-CHROMATOGRAPHEN MIT EINEM AUTOMATISCHEN ANALYSENSYSTEM*

G. SCHWEDT**

Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund (Geschäftsführender Institutsleiter Prof. Dr. H.G. Wenzel), Ardeystrasse 67, D-46 Dortmund (B.R.D.)

(Eingegangen am 28. Oktober 1976; geänderte Fassung eingegangen am 15. Januar 1977)

SUMMARY

Separation and fluorimetric determination of adrenaline and noradrenaline. Combination of a high-pressure liquid chromatograph with an automatic analysis system

The possibilities for a high-pressure liquid chromatographic analysis combined with automatic fluorimetric detection of the catecholamines adrenaline and noradrenaline are described.

The optimal conditions are given for a fast separation by ion exchange and reversed-phase chromatography, and for the sensitive fluorimetric determination of adrenaline by the trihydroxyindole technique when a high excess of noradrenaline is present.

EINLEITUNG

Für die Analyse der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin wird vor allem in der klinisch-chemischen Analytik die sehr empfindliche fluorimetrische Bestimmung als Trihydroxyindol-Derivate verwendet (siehe z.B. Lit. 1). Diese Methode hat jedoch den Nachteil, dass beide Amine nicht ohne gegenseitige Störungen bestimmt werden können. Diese Störungen wirken sich bei der Adrenalinbestimmung besonders dann aus, wenn Noradrenalin in einem hohen Überschuss neben sehr geringen Adrenalinmengen vorliegt, wie es in biologischem Material der Fall ist.

Die Bestimmung beider Amine erfolgt in der zur Zeit verbreitet angewendeten Routineanalytik nach der Abtrennung aus Urin oder Serum an Aluminiumoxid oder Ionenaustauschern [1]. In den Eluatzen werden Adrenalin und Noradrenalin dann nebeneinander durch die Oxidation bei unterschiedlichen pH-

* Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen eines Referates während der "Königsteiner Chromatographie-Tage für HPLC", 13—15. Oktober 1975, vorgetragen.

**Neue Adresse: Gesamthochschule Siegen, Fachbereich 8, Adolf-Reichwein-Strasse 2, D-59 Siegen 21, B.R.D.

Werten in zwei Arbeitsgängen bestimmt.

Mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) sollte versucht werden, nach einer vorhergehenden Trennung diese empfindliche Reaktion der Amine in einem automatisch-fluorimetrischen Analysensystem als Detektor anzuwenden. Die Beseitigung der gegenseitigen Störungen und eine schnellere und rationellere Methode für die Routine sollten dadurch möglich werden. Erste Versuche wurden bereits von Mori [2–5] durchgeführt: Analysenzeiten von 20–45 min veranlassten uns jedoch, sowohl in der HPLC als auch für das Reaktionssystem nach Möglichkeiten für eine schnellere Methode zu suchen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Geräte

HPLC. Hochdruckpumpe Modell 6000 A (Waters Assoc., Königstein, B.R.D.). Probeninjektionssystem Modell U 6 K; Zweistrahl-Mehrwellenlängen-UV/VIS-Photometer Modell 440 (Waters); 6-Wege-Ventil als Probenaufgabenventil mit 100- μ l Schleife (Valco-Princip, bezogen von Dupont, Bad Nauheim, B.R.D.).

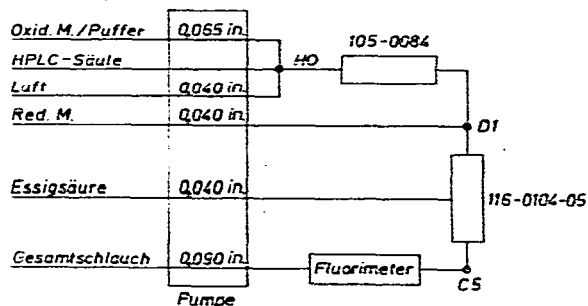


Fig. 1. Fließschema für das Reaktionssystem. (Einzelheiten siehe Experimenteller Teil, Geräte).

Automatisches Analysensystem. Gilson Spectro/Glo Filter Fluorimeter mit Fluorescamin-Filtern; Durchflussküvette, Pyrex-Glasrohr, O.D. 6 mm, I.D. ca. 4 mm; Pumpe, Gilson Minipuls II (Gilson, Abimed, Düsseldorf, B.R.D.). Reaktionseinheit, (aus Hajoka-Ersatzteilen der Fa. Kleinfeld, Hannover, B.R.D.). Mischspiralen Kat. Nr. K 105-0084 (14 Schleifen, 3,4 mm I.D.) und K 116-0104-05 (28 Schleifen, mit Anschluss in der Mitte, 2,4 mm I.D.), Zwischen- und Verbindungsstücke H0 und D1, Entlüfter C5, Pumpenschläuche aus Polyäthylen (I.D. (in.) siehe Fig. 1), Verbindungsschlauch 1/16 in. I.D.). Die Glasteile sind untereinander bzw. mit den Schläuchen durch Schlauchstücke und "Nipples" (N5 und N6) verbunden.

Chemikalien und Lösungen

Chemikalien. Adrenalin (L-Adrenalin-bitartrat pharm. (Serva), Heidelberg, B.R.D.); Noradrenalin (L-Noradrenalin-bitartrat pharm.; Serva); Isopropyl-

noradrenalin (DL-Isopropyl-arterenol hydrochlorid pharm; Serva).

Lösungen: freies Amin, 1 mg pro/ml 0.1 N Salzsäure, Verdünnungen 1:50; 2-Mercaptoäthanol, reinst (Serva). All übrigen Chemikalien mit den Reinheitsgrad "zur Analyse" (Merck, Darmstadt, B.R.D.).

Reduktionslösung. (a) 5% Mercaptoäthanol-Lösung, (b) 20% Natriumsulfidlösung, (c) 10 N Natronlauge. Gleiche Volumina der Lösungen a-c werden gemischt.

Pufferlösungen. Falls nicht anders angegeben, 0.5 M Borsäure-Lösungen, die mit Ameisensäure oder Natronlauge auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt werden, mit einem Gehalt von $2 \cdot 10^{-3}\%$ Kupferacetat.

Säulenmaterialien zur HPLC. Kationenaustauscher (Sulfonsäuregruppen) Vydac-401 SA (auf inerten Glasskugeln, Teilchengröße 30–44 μm); Kationenaustauscher (Sulfonsäuregruppen, chemisch gebunden an Kieselgel) Nucleosil 10-SA (Teilchengröße 10 μm); Nucleosil 10-C₁₈ (Octadecylgruppen chemisch gebunden an Kieselgel, Teilchengröße 10 μm); alle Materialien von Machery, Nagel u. Co., Düren, B.R.D.).

Methodik

Aus der chemischen Umsetzung ergibt sich der Aufbau des Reaktionssystems in die Teile für die Oxidation, Isomerisierung (Alkalisierung und Reduktion) und Ansäuerung. Das automatische Analysensystem besteht aus dem eigentlichen Reaktionssystem, einer Pumpe und einem Fluorimeter mit Durchflussküvette (Fig. 1).

Als innerer Standard für die chromatographische Trennung und fluorimetrische Bestimmung wurde Isopropyl-noradrenalin eingesetzt, das in Urin und Blut nicht vorhanden ist. Die Optimierung des Reaktionssystems erfolgte im Hinblick auf folgende Anforderungen: Das in biologischen Materialien in der niedrigsten Konzentration auftretende Adrenalin sollte am empfindlichsten bestimmt werden. Die Fluoreszenzintensität sollte unter diesen Bedingungen für Noradrenalin so niedrig liegen, dass bei Mengenverhältnissen von etwa 1:5 (wie sie z.B. in einem normalen Urin vorliegen) gleich hohe Signale erhalten werden. Isopropyl-noradrenalin sollte ebenfalls bestimmbar sein. Untersucht und optimiert wurden die "chemischen" Einflüsse des Oxidations-pH-Wertes, der Art des Puffers, der Konzentration katalytisch wirksamer Kupferionen, der Alkalität und der Konzentration und Art des Reduktionsmittels für die Isomerisierung, der Säurekonzentration beim Ansäuern und der "physikalische" Einfluss der Pumpengeschwindigkeit (speed-Zahl) im System. Diese Messungen wurden ohne Verbindung mit der HPLC-Säule durch Ansaugen wässriger Lösungen der Amine mit einem Probenschlauch (0.045 in I.D., 15 sec. Saugzeit) durchgeführt.

Aus den optimalen Reaktionsbedingungen für die fluorimetrische Analyse von Adrenalin und Noradrenalin (siehe Ergebnisse und Diskussion) ergeben sich die Anforderungen an die mobile Phase für die HPLC: Mit einem Formiatpuffer pH 4 wurden die Trennmöglichkeiten sowohl durch Ionenaustausch als auch "reversed-phase"-Chromatographie untersucht. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor bei 280 nm.

Der Ausgang der HPLC-Säule wurde für die fluorimetrischen Analysen mit dem

automatischen Analysensystem direkt über eine Kapillare mit dem Verbindungsstück HO des Reaktionssystems verbunden.

Für die Messungen mit dem UV-Detektor erfolgte die Probenaufnahme durch das Probeninjektionssystem. Bei der Verbindung der Hochdruckpumpe mit dem "Reaktionsdetektor" wurde das 6-Wege-Ventil mit 100 μ l-Schleife eingesetzt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Oxidation der Katecholamine kann sowohl mit Jod als auch mit Kaliumhexacyanoferrat (III) (siehe z.B. Lit. 6) durchgeführt werden. Für diese Methoden sind bereits eine Anzahl automatisch-fluorimetrischer Analysensysteme beschrieben worden. Eigene Untersuchungen haben gezeigt [7], dass im beschriebenen Reaktionssystem mit Kaliumhexacyanoferrat (III) höhere Fluoreszenzausbeuten als mit Jod erzielt werden. Auch für die Reduktion werden verschiedene Reduktionsmittel angegeben, z.B. Ascorbinsäure, Natriumsulfit, Mercaptoäthanol u.a. [6]. Bei der Verwendung von Ascorbinsäure oder einem Gemisch aus Sulfit und Mercaptoäthanol werden etwa gleich grosse Fluoreszenzausbeuten erhalten. Wegen der grösseren Stabilität wurde das Gemisch aus Sulfit und Mercaptoäthanol bevorzugt. Durch das Ansäuern nach der Isomerisierung im Alkalischen wird die Fluoreszenzausbeute nochmals erhöht [8].

Für dieses Verfahren erfolgte eine Optimierung der Reaktionsbedingungen. Die pH-Abhängigkeit der Oxidation [1] bei Anwesenheit von Kupferionen und die Abhängigkeit von der Konzentration des Oxidationsmittels (Fig. 2) ermöglicht die Einstellung des Systems auf gleiche Fluoreszenzintensitäten für Adrenalin und Noradrenalin bei einem Mengenverhältnis von z.B. 1:5. Im Hinblick auf die Auswahl der mobilen Phase für die HPLC wurde der Einfluss verschiede-

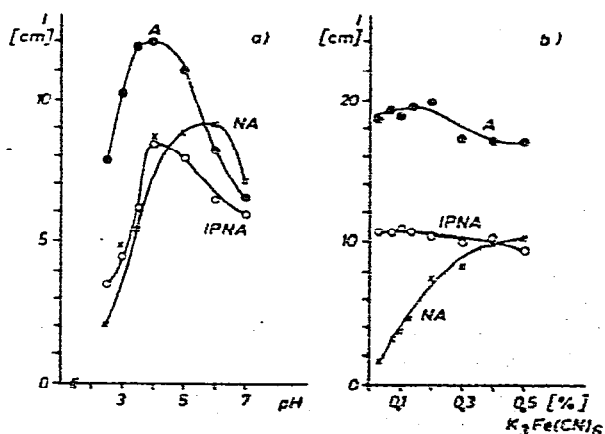


Fig. 2. Abhängigkeiten der Fluoreszenzintensitäten für Adrenalin (A), Noradrenalin (NA) und Isopropyl-noradrenalin (IPNA).

(a) vom pH-Wert der Oxidation, (b) von der Konzentration des Oxidationsmittels (pH 6).

Lösungen der Amine (200 ng/ml) in Puffer, Probenschlauch 0.045 in. I.D., Pumpengeschwindigkeit 1.8 ml/min., Spülen zwischen den Proben mit Puffer-Lösung.

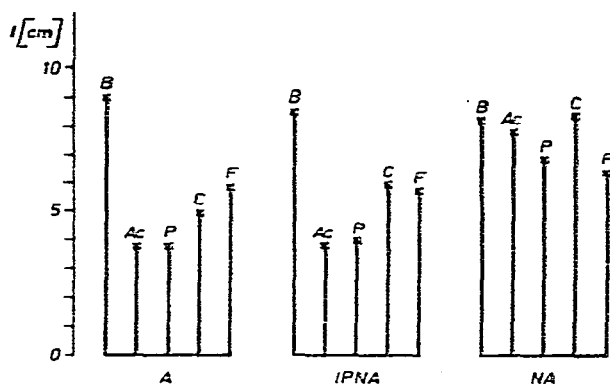


Fig. 3. Einfluss der Pufferionen auf die Fluoreszenzintensitäten (0.2 M Pufferlösungen, pH 6). Lösungen der Amine in Wasser, 0.4% $K_3Fe(CN)_6$ in Puffer, P = Phosphat, Ac = Acetat, F = Formiat, C = Citrat, B = Borat.

dener Pufferlösungen gleichen pH-Wertes auf die Fluoreszenzausbeute für Adrenalin, Noradrenalin und Isopropyl-noradrenalin untersucht. Fig. 3 zeigt die erhebliche Verringerung der Fluoreszenzintensität für Adrenalin in anderen Puffern als Borat.

In der Tabelle I sind die bisher beschriebenen HPLC-Trennungen für die Katecholamine zusammengestellt: Für die Trennung an Ionenaustauschern wurden vor allem Phosphatpuffer verwendet, die jedoch für anschließende fluorimetrische Bestimmung wegen der Verringerung an Fluoreszenzausbeute wenig geeignet sind.

Mit Boratpuffern konnten jedoch an Ionenaustauschern wie Vydac 401 SA und Nucleosil 10 SA keine Trennungen erzielt werden vermutlich wegen der komplexierenden Wirkung der Borationen. Ameisensäure- und Formiatpufferlösungen erwiesen sich dagegen als geeignete mobile Phasen (optimale HPLC-Bedingungen siehe Fig. 4 und 5). Die Trennung ist sowohl mit Ionenaustauschern als auch mit der "reversed-phase"-Chromatographie möglich. Die günstigste und schnellste Trennung zwischen Adrenalin und Noradrenalin wird mit der "reversed-phase"-Chromatographie erzielt (Fig. 6).

Für die Verbindung der HPLC mit der fluorimetrischen Detektion in einem automatischen Analysensystem ergibt sich die Frage nach der Verringerung der Auflösung (R) durch das Reaktionssystem. Die direkte Verbindung einer chromatographischen Säule mit einem chemischen Reaktionssystem für die photometrische Bestimmung ist bereits beschrieben worden [16,17].

Durch die Segmentierung des Flüssigkeitsstroms mit Luftblasen (AutoAnalyzer-Prinzip der Fa. Technicon) wird eine übermäßige Diffusion und damit Verbreiterung der Banden verhindert. Die Veränderungen in der Auflösung durch das nachgeschaltete Reaktionssystem zeigen die Fig. 4–6 für die verschiedenen Trennmöglichkeiten.

Verändert man die Pumpengeschwindigkeit und damit die lineare Geschwindigkeit im Analysensystem, so wird eine Abhängigkeit der Auflösung von der Durchflussgeschwindigkeit erkennbar (Beispiel Fig. 7). Bei hohen Geschwin-

HPLC-TRENNUNGEN DER KATECHOLAMINE (LITERATURÜBERSICHT)

o.A. ohne Angabe.

Trennmateriel	Säulenabmessungen	Mobile Phase	Druck (p.s.i.)	Durchflußrate (ml/min)	Analysezeit für Adrenalin und Noradrenalin (min)
Zipax SCX	1 m X 2.1 mm I.D.	0.1 M Na-Acetat in 0.02 M Essigsäure pH 5.3 (40°)	1000	1.0	6
	1 m X 2.1 mm I.D.	0.05 M Na-Acetat in 0.01 M Essigsäure (40°)	1200	1.4	15
	1 m X 2.1 mm I.D.	0.075 M NaH ₂ PO ₄	570	0.5	15
	1 m X 2.1 mm I.D.	0.15 M NaH ₂ PO ₄	560	0.4	15
	1 m X 2.1 mm I.D.	0.05-0.45 M NaH ₂ PO ₄ (0.04 M/min)	ca. 570	ca. 0.4	15
	1 m X 2.1 mm I.D. 50 cm x 2 mm I.D.	0.1 M Perchlorsäure	250-400	0.3-0.5	ca. 5-6
Vydec Kationenaustauscher	50 cm X 2 mm I.D.	0.01 M Schwefelsäure- 0.04 M Na-Sulfat	o.A.	0.40	5
Bondapak CX/Corsil	61 cm X 2 mm	10.5 g Citronensäure-2.1 ml Essigsäure-4.8 g NaOH-8.2 g Na-Acetat ad 2 l, pH 5.1 (0.2 m Na')	o.A.	2	3
Rarist-10 SCX DuPont SCX	25 cm X 4.6 mm 8 ft. X 3 mm	0.5 M NH ₄ H ₂ PO ₄ pH 4.36 0.2 N Ammoniumphosphat, pH 7.0	375 1200	0.76 1.0	15 18
ODS/TMS-Kieselgel (5 µm)	125 mm X 5 mm I.D.	Acetonitril-Wasser-konz. Schwefelsäure (10:90:0.3)	1100	o.A.	5

digkeiten ist der Verlust an Auflösung am geringsten. Die Erhöhung der Durchflussgeschwindigkeit hat jedoch gleichzeitig einen Einfluss auf die Umsetzung der Katecholamine.

Mit Erhöhung der Pumpengeschwindigkeit werden (ohne Verbindung zur HPLC-Säule) bei gleichbleibender Saugzeit steigende Volumina an Katecholamin-Lösungen in das System aufgenommen. Wie Fig. 8 zeigt, erniedrigt sich jedoch die Fluoreszenzausbeute für Noradrenalin und Isopropyl-noradrenalin mit steigender speed-Zahl, für Adrenalin steigt sie dagegen linear an. Die Reaktionszeiten sind demnach für Noradrenalin und Isopropyl-noradrenalin zu gering.

Die besonderen Vorteile einer Verbindung von HPLC mit einem automatisch-fluorimetrischen Analysensystem liegen in der schnellen, getrennten und empfindlichen Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin. Trotz einer Verringerung der Auflösung ist eine quantitative Analyse beider Amine auch bei

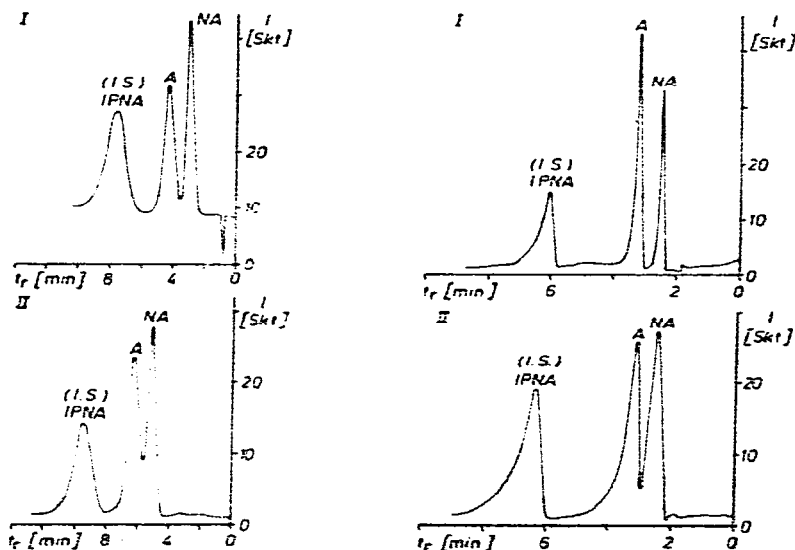


Fig. 4. HPLC-Trennung von Adrenalin (A) und Noradrenalin (NA), Ionenaustausch (IPNA = Isopropyl-noradrenalin). Säule, 500 × 2.1 mm I.D.; Packungsmaterial; Vydac 401-SA, Trocken gepackt; Mobile Phase, 0.5 M Ameisensäure; Durchfluss, 0.6 ml/min; Druck, 35 bar; Temperatur, 22°; Dosiervolumen 100 μ l (100 ng A, 500 ng NA, 500 ng IPNA für II). (I) UV-Detektor: 280 nm; (II) automatisches Analysensystem: Fluorimeter 1/100 der maximalen Empfindlichkeit; Pumpe, speed (7.2 ml/min); 0.1% K₂Fe(CN)₆ - 2 · 10⁻²% Cu-Acetat - 0.5 M Formimat - 0.2 M Borat-Puffer (pH 4) - 6 N Essigsäure.

Fig. 5. HPLC-Trennung von Adrenalin (A) und Noradrenalin (NA), Ionenaustausch (IPNA = Isopropyl-noradrenalin). Säule, Fertigsäule (Macherey, Nagel & Co), 300 × 4 mm I.D.; Packungsmaterial: Nucleosil 10-SA; mobile Phase; 1 M Natriumformiat-Puffer pH 4; Durchflussrate, 1.8 ml/min; Druck, 140 bar; Temperatur, 22°; Dosiervolumen, 100 μ l (= 100 ng A, 500 ng Na, 200 ng IPNA für II). (I) UV-Detektor: 280 nm, (II) automatisches Analysensystem: Fluorimeter 1/100 der maximalen Empfindlichkeit; Pumpe; speed (9.6 ml/min); 0.04% K₂Fe(CN)₆ - 0.2 M Boratpuffer (pH 4) - 2 · 10⁻²% Cu-Acetat - 6 N Essigsäure.