

CHROMBIO. 2231

Note**Chromatographie en phase liquide automatique de la dopamine urinaire**

F. GUYON*, V. LECOMTE-JOULIN, C. FALCY et J.P. DUPEYRON

Laboratoire de Biochimie et de Toxicologie, Hôpital Hôtel-Dieu, Parvis Notre-Dame, 75181 Paris Cedex 04 (France)

(Reçu le 6 mars 1984; manuscrit modifié reçu le 5 mai 1984)

Dans l'organisme la dopamine est un neurotransmetteur à la fois central et périphérique, ainsi que le précurseur de la biosynthèse de deux autres catécholamines, la noradrénaline et l'adrénaline. La dopamine excrétée dans l'urine humaine provient indistinctement de territoires systémiques et/ou des régions centrales riches en dopamine, encore que la forte teneur des urines — comparée à celle du plasma — ait fait évoquer une production locale rénale par décarboxylation de la dopamine [1].

Néanmoins, on a signalé une majoration de l'excrétion urinaire de la dopamine dans les neuroblastomes [2], dans certains phéochromocytomes où cette majoration concerne aussi la noradrénaline, dans les stress [3] et dans les états d'hypertension artérielle [4].

Au niveau central on a observé une diminution de l'excrétion urinaire de dopamine, concomitante de l'akinésie, au cours de la maladie de Parkinson. Par ailleurs une application intéressante du dosage de la dopamine urinaire pourrait consister en l'estimation de l'activité de la dopamine- β -hydroxylase [5] qui représente un marqueur de l'activité sympathique.

L'analyse des catécholamines dans les milieux biologiques fait classiquement appel à une ou deux étapes d'isolement, précédant une séparation chromatographique en phase liquide. Ces deux étapes sont très généralement une fixation des catécholamine sur résine échangeuse d'ions et/ou une fixation en milieu basique sur alumine convenablement activée [6]. Ces opérations sont menées soit sur de petites colonnes chromatographiques (résine) soit par simple équilibre (alumine). Après cette étape préliminaire le type de séparation le plus souvent utilisé est la chromatographie de partage à haute performance, à polarité de phases inversée avec formation de paires d'ions, comme le montre une revue récente [7]. Le système de détection utilise soit l'oxydation électro-

chimique [8] soit la fluorescence naturelle des catécholamines [9] ou bien la fluorescence de dérivés formés en sortie de colonne chromatographique [10, 11].

Le choix d'une ou deux étapes d'isolement dépend essentiellement de la complexité du milieu biologique considéré. Le choix de la méthode de détection dépend surtout des concentrations à doser, la détection électrochimique est plus sensible mais en général plus délicate à employer en analyse de routine.

En ce qui concerne le dosage de l'adrénaline, noradrénaline et dopamine dans l'urine, les concentrations assez élevées permettent l'utilisation d'une détection fluorimétrique des molécules elles-mêmes. Pour l'adrénaline et la noradrénaline l'utilisation de deux étapes préalables d'isolement (résine + alumine) est généralement pratiquée compte tenu de l'interférence de certains composés endogènes. En revanche, pour la dopamine (présente à plus forte concentration) une seule étape de fixation sur alumine paraît suffisante.

Nous avons recherché à automatiser l'analyse de la dopamine urinaire de façon simple en employant la fixation sur une précolonne d'alumine suivie d'une séparation par chromatographie de paires d'ions et détection spectrofluorimétrique.

Un système de précolonne, garnie d'une phase stationnaire de même nature que celle de la colonne analytique [12] ou d'un support différent [13], a déjà été utilisé pour des analyses de substances médicamenteuses dans les prélèvements biologiques.

L'utilisation de microcolonnes d'alumine a été proposée pour l'analyse des catécholamines mais dans le cadre d'un système assez compliqué [14].

Nous avons appliqué le principe d'une précolonne utilisée en "back flush" en mettant en oeuvre un matériel limité (et en particulier une seule pompe chromatographique) présent dans beaucoup de laboratoires.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Réactifs

Sel disodique de l'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA disodique), Fluka (Buchs, Suisse). Tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris), acide ascorbique, octylsulfate de sodium, alumine pour chromatographie LiChrosorb Alox T (granulométrie 10 μm), E. Merck (Darmstadt, R.F.A.). Dihydrogénophosphate de potassium, acide citrique, méthanol, Prolabo (Paris, France). Gel de silice greffée alkyle Nucleosil C₁₈ (granulométrie 5 μm), Macherey, Nagel & Co. (Düren, R.F.A.). Tous ces réactifs sont de qualité pour analyse. La dopamine sous forme de chlorhydrate et la 3,4-dihydroxybenzylamine, sous forme de bromhydrate (DHBA) sont des produits Sigma (St. Louis, MI, E.U.).

Des filtres GF/F Whatman (Springfield Mill, Kent, Grande-Bretagne) sont utilisés pour filtrer les phases mobiles, et des filtres Millex HA adaptables sur seringue (Millipore, Bedford, MA, É.U.) permettent de filtrer les échantillons urinaires.

Appareillage

Le schéma du système utilisé est représenté Fig. 1. Il comprend une pompe chromatographique Altex 110 A (Berkeley, CA, É.U.), alimentée par l'inter-

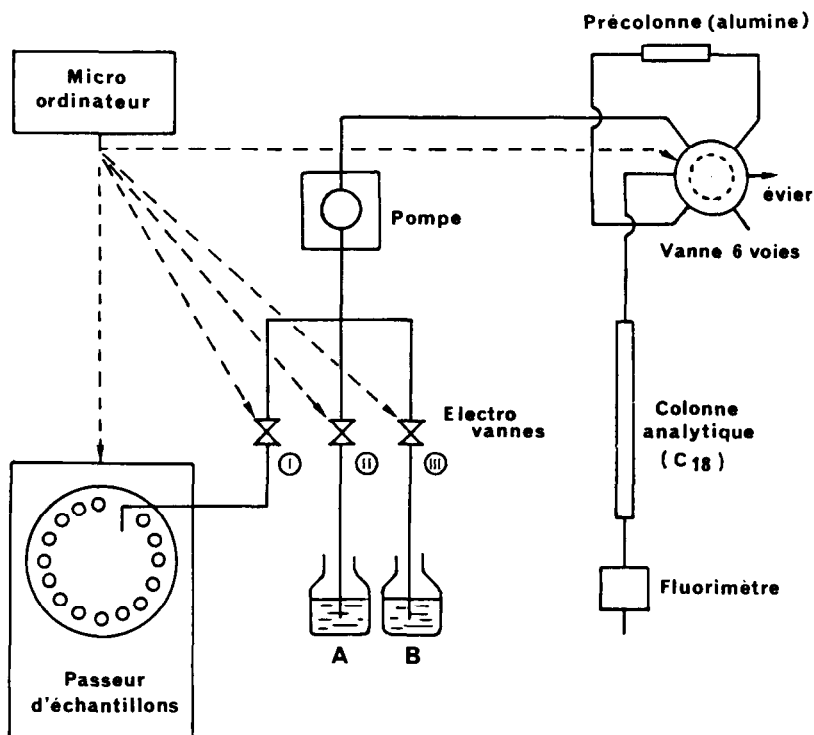


Fig. 1. Schéma de principe du système chromatographique. (A) Tampon pH 8.6 (Tris 0.1 M, EDTA disodique 0.002 M, acide ascorbique 0.001 M). (B) Phase mobile [octylsulfate 0.003 M, dihydrogénophosphate de potassium 0.035 M, acide citrique 0.03 M, acide ascorbique 0.001 M et 14% (v/v) de méthanol]. Sur le passeur d'échantillons un godet sur deux contient un liquide de rinçage (EDTA disodique 0.002 M, acide ascorbique 0.001 M ajusté à pH 7).

médiaire de trois électrovannes (General Valve, Fairfield, NJ, É.U.). Une précolonne Merck Hibar, modifiée par nos soins pour en réduire la longueur (1×0.3 cm I.D.) et une colonne analytique (15×0.48 cm I.D.) sont reliées à une vanne six voies Rhéodyne 7010 (Cotati, CA, É.U.), à commande électrique (Touzart et Matignon, Vitry, France) selon le schéma de la Fig. 2. La précolonne est remplie à sec (alumine), la colonne analytique est remplie classiquement par voie humide (silice greffée alkyle). Le détecteur est un spectrofluorimètre JY 3 (Jobin et Yvon, Longjumeau, France) (excitation 282 nm, fente 10 nm, émission 315 nm, fente 10 nm). Un passeur d'échantillon Sampler IV (Technicon, Tarrytown, NY, É.U.) est utilisé. Les trois électrovannes, la vanne six voies, l'avancement du passeur d'échantillons sont commandés par un microordinateur Zx 81 Sinclair (Oxford, Grande-Bretagne). Ce dernier est équipé d'une mémoire additionnelle 64 K Memopak de Memotech (Oxford, Grande-Bretagne) et d'une interface "entrées-sorties" permettant la commande de huit relais (cinq sont utilisés). La programmation en temps utilise la fonction "pause" dans le programme écrit en basic.

Prélèvement

Au moment du recueil des urines est ajouté 1% d'EDTA disodique et 0.1% d'acide ascorbique, le prélèvement est ensuite congelé. Lors du dosage, à 10 ml

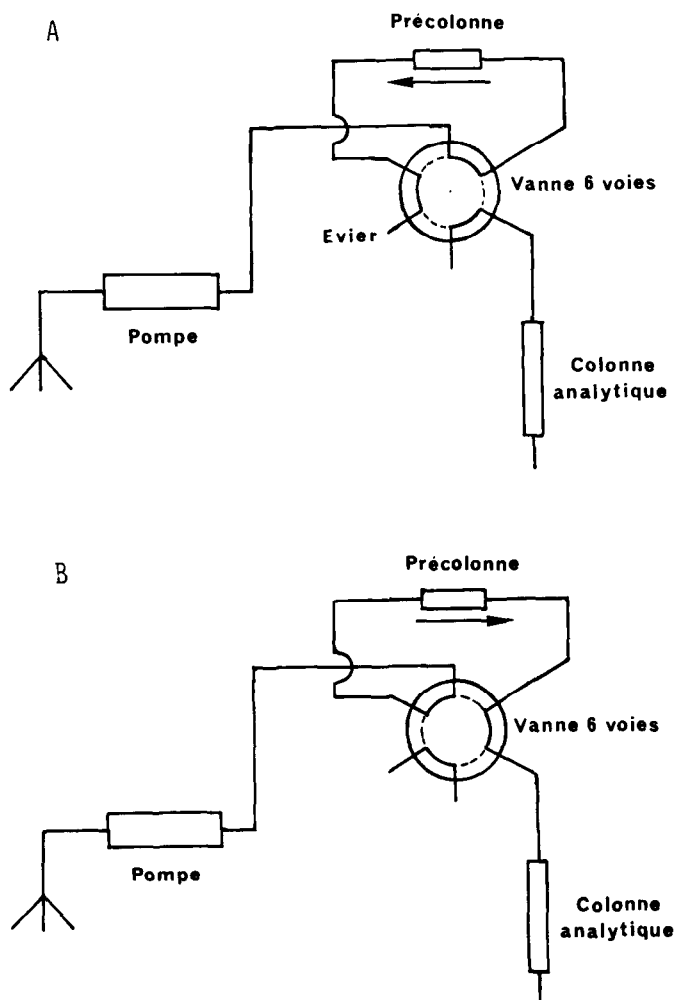


Fig. 2. Schéma de branchement de la vanne six voie. (A) Fixation sur précolonne d'alumine en présence de tampon pH 8.6 (la phase mobile ne circule pas dans la colonne analytique). (B) Éluion chromatographique par la phase mobile acide.

d'urines ainsi traitées est ajouté 0.1 ml d'une solution à 5 mg l^{-1} de DHBA comme étalon interne, l'échantillon est filtré sur filtre Millex HA.

Étalon

Solution-mère de dopamine à 100 mg l^{-1} en base dans l'acide chlorhydrique 0.1 M , conservée au congélateur. Solution-fille à 5 mg l^{-1} dans l'acide chlorhydrique 0.1 M . Solution de DHBA à 5 mg l^{-1} dans l'acide chlorhydrique 0.1 M . Une gamme de dopamine de 0.05 à 0.3 mg l^{-1} (0.32 à $1.95 \mu\text{mol l}^{-1}$) contenant 0.05 mg l^{-1} de DHBA est préparée en présence de 1% d'EDTA disodique et 0.1% d'acide ascorbique.

Principe de la méthode

Le principe consiste à fixer la dopamine à pH 8.6 sur la précolonne

d'alumine, le tampon basique ne circulant pas sur la colonne analytique qui serait rapidement dégradée en raison de la solubilité du gel de silice à ce pH. Puis après élimination du tampon présent dans le volume poreux de la précolonne, par passage d'une solution neutre, l'élution de la dopamine est obtenue par circulation d'une phase mobile acide, en sens inverse de celui utilisé pour la fixation.

Le prélèvement n'est amené à pH basique par mélange avec le tampon pH 8.6 qu'au moment de la fixation sur précolonne d'alumine (par mélange en amont de la pompe) pour éviter la dégradation de la dopamine instable à ce pH.

Chromatographie

Le débit de la pompe est 2 ml min^{-1} .

Fixation sur la précolonne. La vanne six voies étant en position A représentée sur la Fig. 2, la vanne II (Fig. 1) est ouverte pendant 3 min, la précolonne est alors conditionnée par passage de 6 ml de tampon basique (Tris 0.1 M, EDTA disodique 0.002 M, acide ascorbique 0.001 M, ajusté à pH 8.6), qui est ensuite rejeté à l'évier. Le passeur d'échantillon étant en position de prélèvement les vannes I et II sont ouvertes alternativement pendant 3 min (toutes les 6 sec), pour amener le prélèvement à pH 8.6 par mélange avec la solution tampon basique. Le volume de liquide circulant pendant cette période est de 6 ml dont 3 ml d'échantillon et 3 ml de tampon basique. Sur le passeur un godet de prélèvement et un godet de liquide de rinçage (EDTA disodique 0.002 M, acide ascorbique 0.001 M, ajusté à pH 7 par de la soude 1 M) alternent. La vanne II restant seule ouverte le passeur change de godet, la vanne I s'ouvre, la vanne II se ferme. Pendant 3 min les canalisations depuis l'aiguille de prélèvement jusqu'à la précolonne d'alumine, sont rincées par la solution neutre prélevée dans le godet de rinçage.

Elution chromatographique. La vanne III est ouverte, en même temps que la vanne I se ferme et que la vanne six voies vient en position B représentée sur la Fig. 2. L'élution chromatographique des solutés préalablement fixés sur l'alumine en milieu basique a lieu grâce à une phase mobile acide de chromatographie de paires d'ions décrite par Krstulovic et al. [15] [octylsulfate 0.003 M, dihydrogénophosphate de potassium 0.035 M, acide citrique 0.03 M, et 14% (v/v) de méthanol] à laquelle nous rajoutons de l'acide ascorbique (0.001 M) pour éviter les risques d'oxydation de la dopamine.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les chromatogrammes obtenus à partir d'une solution étalon et d'une urine humaine normale sont représentés Fig. 3. Dans le cas de l'urine les pics de dopamine et de DHBA apparaissent bien séparés des composés endogènes.

La présence de la précolonne nuit peu à l'efficacité du système chromatographique (finesse des pics). En effet, la comparaison de chromatogrammes enregistrés après injection directe en tête de colonne ou par élution à partir de la précolonne après fixation sur cette dernière, a montré que l'efficacité du système colonne/précolonne reste supérieure à 80% de celle de la colonne chromatographique utilisée seule (en nombre de plateaux théoriques). Ceci

montre que la libération de la dopamine et du DHBA fixés sur l'alumine est rapide en présence de la phase mobile chromatographique acide. L'inversion du sens de circulation de la phase liquide entre la fixation et l'élution contribue à ce bon résultat.

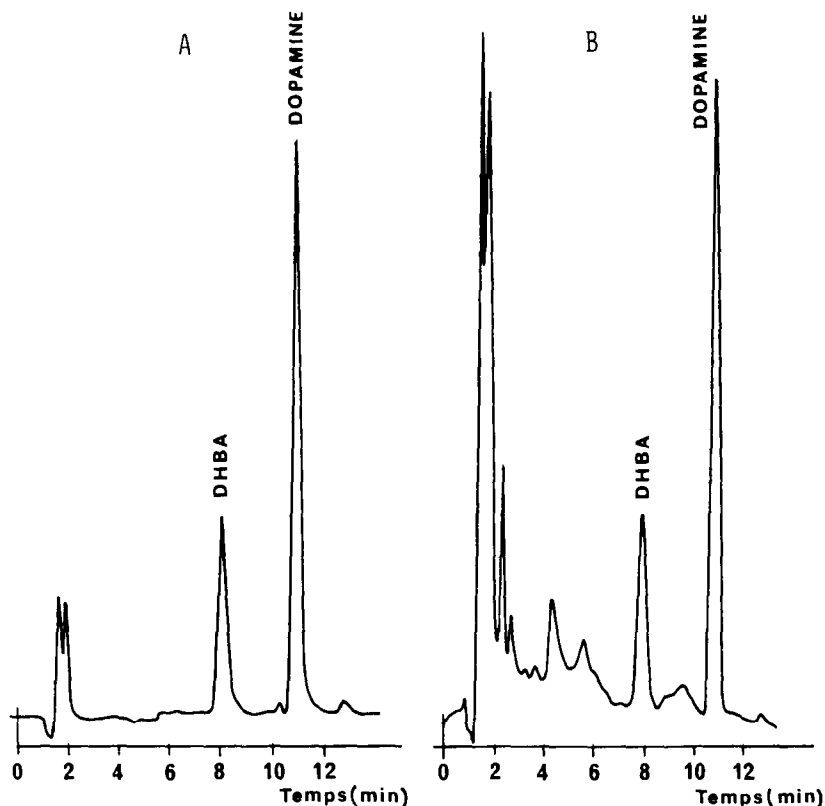


Fig. 3. (A) Chromatogramme correspondant à une solution étalon de dopamine (étalon interne = DHBA) après fixation sur précolonne d'alumine (1×0.3 cm) et séparation par formation de paires d'ions. Colonne: 15×0.48 cm; phase stationnaire: Nucleosil C_{18} , $5 \mu\text{m}$; Phase mobile: selon Fig. 1; débit: 2 ml min^{-1} ; température: 20°C ; concentration de dopamine dans l'échantillon: 0.2 mg l^{-1} ($1.3 \mu\text{mol l}^{-1}$). (B) Prélèvement urinaire dans les mêmes conditions. Concentration de dopamine déterminée: 0.23 mg l^{-1} ($1.5 \mu\text{mol l}^{-1}$).

La courbe de calibration pour la dopamine est linéaire au-delà de $1 \mu\text{g}$ injecté; c'est-à-dire, en considérant un prélèvement de 3 ml, au-delà de 0.33 mg l^{-1} ($2.15 \mu\text{mol l}^{-1}$) dans l'urine. Ceci est bien adapté aux valeurs fréquentes de concentration de dopamine dans l'urine humaine normale (pour une diurèse moyenne de 1.5 l): $0.04\text{--}0.26 \text{ mg l}^{-1}$ ($0.28\text{--}1.7 \mu\text{mol l}^{-1}$).

Le coefficient de variation pour le dosage répété de la dopamine sur un même échantillon d'urine a été 2.7% ($n = 10$). Le rendement d'extraction, de la dopamine rajoutée à l'urine, par l'alumine de la précolonne était $98.2 \pm 3.2\%$ (moyenne \pm déviation standard, $n = 10$). L'utilisation prolongée d'un même échantillon d'alumine ne semble pas poser de problème (jusqu'à 100 analyses successives). La sensibilité, la reproductibilité, la précision et le rendement d'extraction sont suffisants pour l'analyse de la dopamine urinaire. Si ce

dispositif automatique d'analyse qui n'utilise qu'une seule pompe fonctionne sans arrêt, environ 70 échantillons peuvent être traités par jour.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. Da Prada, *Trends Pharmacol. Sci.*, 1 (1980) 157.
- 2 W. Von Studnitz, H. Kaser et A. Sjoerdama, *N. Engl. J. Med.*, 269 (1963) 232.
- 3 U.S. Von Euler et S. Hellner, *Acta Physiol. Scand.*, 22 (1951) 161.
- 4 O. Kuchel, N.T. Buu, T. Unger, M. Lis et J. Genest, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 48 (1979) 425.
- 5 R.D. Hoeldtke et P.L. Stetson, *Anal. Biochem.*, 105 (1980) 207.
- 6 A.H. Anton et D.F. Sayre, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 138 (1962) 360.
- 7 A.M. Krstulovic, *J. Chromatogr.*, 229 (1982) 1.
- 8 L.J. Felice, J.D. Felice et P.T. Kissinger, *J. Neurochem.*, 31 (1978) 1461.
- 9 G.P. Jackman, *Clin. Chem.*, 26 (1980) 1623.
- 10 K. Mori, *J. Chromatogr.*, 218 (1981) 631.
- 11 R.C. Causon et M.E. Carruthers, *J. Chromatogr.*, 229 (1982) 301.
- 12 P. Schauwecker, R.W. Frei et F. Erni, *J. Chromatogr.*, 136 (1977) 63.
- 13 G. Schmidt et W. Salavin, *Chromatogr. Newsl.*, 9 (1981) 21.
- 14 M. Goto, T. Nakamura et D. Ishii, *J. Chromatogr.*, 226 (1981) 33.
- 15 A.M. Krstulovic, S.W. Dziedzic, L. Bertani-Dziedzic et D.E. Dirico, *J. Chromatogr.*, 217 (1981) 523.