

## Eine vereinfachte Methode zur Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin im Harn

Von

KONRAD LAUBER

*Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Bern (Direktor: Prof. Dr. med. H. Aebi)*

(Der Schriftleitung zugegangen am 8. November 1963)

Eine Methode zur Isolierung von Noradrenalin und Adrenalin und deren fluorimetrische Bestimmung wird in allen Einzelheiten beschrieben. Das Verfahren benutzt die Erfahrungen von EULERS und NADEAUS mit einigen Modifikationen und technischen Verbesserungen. Ein „innerer“ Katecholaminstandard wird verwendet. Die Vor- und Nachteile der 2 pH-Methode und der 2 Filter-Methode (Fluoreszenzmessung an einer Probe bei zwei verschiedenen Wellenlängen des Primärlichts) werden einander gegenübergestellt. An Hand von 10 gesunden Versuchspersonen wird ein vorläufiger Normalbereich für die Adrenalin- und Noradrenalinausscheidung aufgestellt.

The isolation and fluorimetric determination of noradrenalin and adrenalin is described in detail. The method is modified from those of von EULER and NADEAU with technical improvements. An "internal" catecholamine standard is used. The advantages and disadvantages of the 2 pH method and the 2 filter method (fluorescence measurement on one sample at two different primary wavelengths) are compared. The range of adrenalin and noradrenalin excretion was determined for 10 healthy persons.

Die Bestimmung der Katecholamine gehört zu den anspruchsvollsten Analysen im klinisch-chemischen Labor; sie wird daher nur von wenigen Institutionen routinemäßig durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode beschrieben, die es auch dem Nichtspezialisten ermöglichen soll, die Urin-Katecholamine zu bestimmen. Das Verfahren lehnt sich an die von EULER und FLODING (1) bzw. NADEAU und SOBOLEWSKI (2) beschriebenen Prinzipien an: Saure Hydrolyse der Konjugate; Adsorption an Aluminiumoxyd bei schwach alkalischem pH; Elution mit Säure; Überführung der Amine in Lutine; Bestimmung der Lutinkonzentration mittels Fluorimetrie; Differenzierung von Adrenalin und Noradrenalin durch Oxydation bei verschiedenen pH-Werten.

### Methodik

#### Geräte

pH-Meter; Magnetrührer; Filternutsche; Zentrifuge; Photometer mit Zusatz zur Fluoreszenzmessung, z. B. „Eppendorf“; Stoppuhr.

#### Reagenzien

1. Schwefelsäure 10 n: 275 ml konz.  $H_2SO_4$  mit  $H_2O$  ad 1 l.
2. Aluminiumoxyd „aktiv“, „sauer“ (Merck).
3. Natronlauge/Komplexon: 30 g Natriumhydroxyd + 2 g Komplexon III (Dinatriumsalz der Äthylendiamin-Tetraessigsäure) in Wasser auflösen und auf 2 l auffüllen. (In Glasgefäß aufbewahren.)
4. Zitronensäure/Zinksulfat: 35 g Zitronensäure ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) + 0,5 g Zinksulfat ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) in Wasser lösen und auf 1 l auffüllen.
5. Natriumbicarbonat 6,6 proz.
6. Kaliumferricyanid 0,2 proz.

7. Natronlauge 10 proz. (in Glasflasche aufbewahren).

8. Ascorbinsäure 1 proz. (jeden Tag frisch ansetzen).

9. Ascorbat/Natronlauge: Unmittelbar vor Gebrauch 0,4 ml von Lösung 8 und 24 ml von Lösung 7 mischen.

10. Fluoreszenzstandard: Chininsulfatlösungen von 2,5-, 5-, 10-, 25- und 50 mg% in 0,1 n Schwefelsäure.

11. Katecholaminstandard: 15 mg Adrenalin-Base + 90 mg Noradrenalin-Bitartrat-Monohydrat (z. B. von „Fluka“, Buchs, St. Gallen) in 5 ml 1 n HCl auflösen und mit Wasser auf 500 ml verdünnen. (Gehalt 30  $\mu g$  Adrenalin bzw. 90  $\mu g$  Noradrenalin pro ml). Lösung in kleinen Portionen einfrieren; jeden Tag eine neue Portion auftauen.

Etwa einmal pro Monat sollte kontrolliert werden, ob die Standardlösung noch die ursprüngliche Fluoreszenz ergibt: Ca 10 ml Zitronensäure 4 werden mit Bicarbonat 5 am pH-Meter auf pH 6 neutralisiert. Je 20  $\mu l$  Standardlösung werden mit 1,5 ml dieses Puffers resp. 1,5 ml unveränderter Zitronensäure 4 gemischt. Dann wird mit Ferricyanid und Ascorbat entwickelt wie unten beschrieben (vgl. Schema). Die Fluoreszenz der beiden Proben wird gegen Chininsulfat von 25 mg% abgelesen. Sind die Fluoreszenzwerte gegenüber dem frisch hergestellten Standard um mehr als 5% gesunken, dann ist neue Lösung herzustellen.

### Arbeitsweise

#### Harnsammeln

Ca 5 ml konz. Schwefelsäure oder 70 proz. Perchlorsäure werden ins leere Sammelgefäß gegeben. Der Urin muß zur Verhinderung von Autoxydation von Anfang an sauer sein. Die Tagesmenge wird ermittelt und ein Aliquot davon verarbeitet.

#### Hydrolyse

In 6 Reagensgläschen werden je 12 ml Urin mit 1 ml Schwefelsäure 1 gemischt. Zwei Gläschen werden außer-

dem mit 20  $\mu$ l und zwei mit 60  $\mu$ l Standardlösung ver-  
setzt. Die Gläschen werden mit kleinen Bechern ab-  
gedeckt und 20 Min. ins kochende Wasserbad gestellt.  
Die Proben werden dann auf Leitungswassertemperatur  
abgekühlt.

*Adsorption|Elution*

(vorläufig werden nur die Proben ohne und jene mit  
20  $\mu$ l Standard zu Ende verarbeitet)

5 ml der gekochten Urinproben werden in 50 ml-  
Bechergläser übergeführt. Unter kräftigem Rühren  
(Magnetrührer) werden etwa 10 ml Natronlauge/Kom-  
plexon 3 zugetropft. Am pH-Meter wird dann mit der  
gleichen Lösung auf pH  $\sim$  4 weiter neutralisiert.  
0,5 g Aluminiumoxyd 2 wird zugesetzt. Mit einigen  
Tropfen von Lösung 3 wird das pH vorsichtig auf  
8,5 verschoben. Beim ersten Erreichen dieses Wertes  
wird die Stoppuhr gestartet. Während 4 Min. wird unter  
ständigem Rühren das pH auf 8,5 konstant gehalten.  
Eine Spontanverschiebung nach unten wird durch  
weiteren Laugenzusatz kompensiert. Steigt das pH  
irrtümlicherweise auf über 8,7, dann ist die Probe mit  
weiteren 5 ml gekochtem Harn frisch anzusetzen. Nach  
Ablauf der 4 Min. wird der Becherinhalt auf eine  
Nutsche mit relativ hartem Papierfilter (z. B. „Green  
Hydro“ 803; Bittmann, Basel) gegeben und mit Vakuum  
abgesaugt. Das Becherglas wird zweimal mit 10 ml  
Wasser nachgespült. Unmittelbar nach dem letzten  
Trockenlaufen des Filters wird ein Reagensgläschen  
unter die Nutsche gestellt und 1,5 ml Zitronensäure/  
Zinksulfat 4 aufs Filter gegeben. Während 0,5 Min.  
wird die Nutsche bewegt, so daß das Aluminiumoxyd  
aufgewirbelt wird. Das Eluat wird abgesaugt und der  
Elutionsprozeß zweimal mit 1,5 ml Zitronensäure 4  
wiederholt (je 0,5 Min. bewegen vor dem Absaugen).

*Lutinbildung*

Von jedem der vier zu einem Urin gehörenden Eluate  
werden 3mal je 1 ml in 3 Zentrifugengläschen mit den  
Bezeichnungen 6, 3, 0 übergeführt. Mit den 12 Gläschen  
wird weiter verfahren wie in untenstehendem Schema  
angegeben.

Schema für die Lutinbildung

	6	3	0
Eluat	1 ml	1 ml	1 ml
Bicarbonat 5	0,5 ml	—	—
Wasser	—	0,5 ml	0,5 ml
Kaliumferricyanid 6	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml

schütteln und zwischen Ferricyanid- und Laugenzusatz genau  
3 Min. stehenlassen

Ascorbat/Natronlauge 9	3 ml	3 ml	—
Natronlauge 7	—	—	3 ml

gut mischen, zentrifugieren

*Fluoreszenzmessung*

Die Messung wird hier für das „Eppendorf“-Photometer  
beschrieben. Folgende Filter werden verwendet: Primär-  
filter 405/436 m $\mu$ ; Sekundärfilter 500—3000 m $\mu$ . Mit  
Chininsulfatlösung von 2,5 mg% wird die Fluoreszenz  
durch Regulierung der Photometerverstärkung auf  
100 Skalenteile eingestellt. Gegen diesen Bezugswert  
werden alle 12 Proben abgelesen. Ist die Fluoreszenz der  
Proben „St-6“ höher als 100, dann wird eine stärkere  
Chininsulfatlösung als Bezug verwendet.

Schema für die Fluoreszenzmessung

	St <sub>1</sub>	St <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>
6				
3				
0				
I = 6—3				
II = 3—0				

A<sub>1</sub> bzw. A<sub>2</sub>: Urin-Doppelpro-  
ben ohne Standardzusatz; St<sub>1</sub>  
bzw. St<sub>2</sub>: Urin-Doppelproben  
mit Standardzusatz; 6: Bei  
pH 6 oxydiert; 3: Bei pH <3  
oxydiert; 0: Blindfluoreszenz.

*Berechnung:*

(bei Verwendung der Proben mit 20  $\mu$ l Standardzusatz)

$$\mu\text{g}\% \text{ Noradrenalin: } \frac{I_A}{I_{St} - I_A} \cdot 15$$

$$\mu\text{g}\% \text{ Adrenalin: } \frac{II_A - 0,1 \cdot I_A}{II_{St} - 0,1 \cdot I_{St} - (II_A - 0,1 \cdot I_A)} \cdot 5.$$

*Diskussion*

1. Durch das Kochen des stark sauren Urins werden die  
konjugierten Amine gespalten und damit der Bestim-  
mung zugänglich gemacht. Eine Bestimmung der ge-  
samten Katecholamine erscheint uns zuverlässiger als  
die Analyse des freien Anteils, da durch das obliga-  
torische Ansäuern des Urins während des Sammelns die  
Hydrolyse ohnehin schon eingangkommen kann (3).

2. Die Verwendung eines sog. inneren Standards ist  
unbedingt notwendig, weil die beim Adsorptions-  
Elutionsprozeß entstehenden Verluste von Urin zu  
Urin stark schwanken. Auch der sog. Quenching-Effekt  
ist von Probe zu Probe verschieden. Der Zusatz von  
20  $\mu$ l Standardlösung zu 12 ml Harn entspricht einer  
Konzentration von 5  $\mu$ g% Adrenalin und 15  $\mu$ g% Nor-  
adrenalin, auf den Urin bezogen. Bei einem normalen  
Harn erhält man dann für die Proben mit Standard-  
zusatz etwa doppelt so hohe Fluoreszenzen wie für die  
Proben ohne Standard, was ein Optimum an Genauig-  
keit gewährleistet.

Wird der Quotient  $\frac{I_A}{I_{St} - I_A}$  größer als 3, was nur bei  
pathologischem oder hochkonzentriertem Urin vor-  
kommt, dann ist der Analysengang mit den Proben,  
welche 60  $\mu$ l Standard enthalten, zu wiederholen. Ist  
auch für den hohen Standardzusatz der relative Fluores-  
zenzunterschied zwischen „Standard“ und „Analyse“  
zu klein, dann wird der Urin vor der Hydrolyse zehn-  
bis fünfzigfach mit Wasser verdünnt. Das Endresultat  
ist sinngemäß zu vervielfachen.

3. Die Abkühlung der gekochten Harnproben auf einige Grad unter Raumtemperatur empfiehlt sich, weil beim Neutralisieren auf  $\text{pH} = 8,5$  so viel Wärme frei wird, daß die Zimmertemperatur wieder erreicht wird und sich eine Temperaturkorrektur am pH-Meter erübrigt.

4. Die Konzentration der Lauge wurde auf 1,5% angesetzt, weil dann das Endvolumen der auf  $\text{pH} = 8,5$  eingestellten Probe die für den Adsorptionsprozeß optimale Größe erreicht (2). Das zugesetzte Komplexon verhindert die Bildung von Erdalkaliphosphat-Niederschlägen, welche sich auf die Adsorption störend auswirken (2). Es empfiehlt sich, die Lauge über dem pH-Meter aufzustellen und mittels Glasheber mit kurzem Polyvinylschlauch und Quetschhahn am unteren Ende in die Urinprobe tropfen zu lassen. Bei Verwendung von Polyäthylenflaschen für die NaOH wurden schlechtere Fluoreszenzausbeuten erhalten als bei Gebrauch von Glasflaschen (störender Weichmacher?).

5. Zur Filtration wurden früher von uns Glasfritten verwendet, welche sich aber schnell verstopften. Um für alle Proben die gleichen Bedingungen zu erhalten, mußten sie nach jeder Filtration umständlich gereinigt werden. Die von uns gegenwärtig verwendete Vakuumnutsche ist eine einfache Sonderanfertigung aus Polyäthylen, welche ein Festklemmen des Papierfilters gestattet (Abb. 1). Das Filtrieren und Nachwaschen

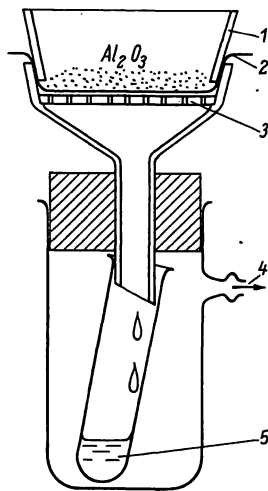


Abb. 1  
Vakuumnutsche

1 = Satt sitzender Ring zum Festklemmen des Papierfilters  
2 = Papierfilter 3 = Siebplatte 4 = Vakuum 5 = Eluat

hat möglichst rasch zu erfolgen, da die Katecholamine bei  $\text{pH} > 6$  leicht autoxydabel sind. Für jede Filtration wird ein neues Filter verwendet. Die Filtration hat sich als unvergleichlich rascher erwiesen als die Zentrifugation, wie sie von NADEAU (2) vorgeschlagen wird.

6. Zur Elution wird Zitronensäure den von andern Autoren (2, 4) vorgeschlagenen Säuren (Essigsäure, Schwefelsäure, Oxalsäure) vorgezogen, weil jene bei  $\text{pH} = 6$  gut puffert und damit die Einstellung dieses

pH-Wertes wesentlich erleichtert. Das Zinksulfat, welches die Lutinbildung katalysiert, wird schon der Zitronensäure und nicht, wie in früheren Arbeiten beschreiben, vor dem Entwickeln jedem Gläschen separat zugesetzt.

7. Die Konzentration des Bicarbonats 5 ist so gewählt, daß beim Mischen von 0,5 ml mit 1 ml Eluat (nicht 1 ml Lösung 4!)  $\text{pH} = 6,0$  resultiert. Bei jeder Neuerstellung von Lösung 4 bzw. 5 sollte mit dem pH-Meter kontrolliert werden (Toleranz  $\pm 0,2$  pH-Einheiten).

8. Durch das Ferricyanid werden die Katecholamine in Adrenochrom bzw. Noradrenochrom übergeführt. Während die Bildung des Adrenochroms bei  $\text{pH} = 6$  und in verdünnter Zitronensäure ( $\text{pH} \leq 3$ ) gleich verläuft, entsteht unterhalb  $\text{pH} 3$  nur etwa 8–10% Noradrenochrom (100% bei  $\text{pH} = 6$ ). Durch Zusatz von Ascorbat in stark alkalischer Lösung werden Adrenochrom und Noradrenochrom in die fluoreszierenden Lutine übergeführt. Bei bloßem Laugen-zusatz werden dagegen die oxydierten Katecholamine zerstört, und man erhält die Blindfluoreszenz der mitisolierten Begleitstoffe.

9. Für die Differenzierung von Adrenalin und Noradrenalin gibt es prinzipiell zwei Methoden: a) Oxydation der Katecholamine bei  $\text{pH} = 6$  und  $\text{pH} \leq 3$  und Fluoreszenzmessung mit ein und demselben Primärlicht (1); b) Oxydation nur bei  $\text{pH} 6$  und Fluoreszenzmessung bei Anregung mit zwei verschiedenen Wellenlängen (2, 5). Die beiden Methoden sind von uns verglichen worden. Die „Zwei-Filter-Methode“ lieferte etwas weniger gut reproduzierbare Resultate als die „Zwei-pH-Methode“, was sich schon rein theoretisch begründen läßt. Die Formeln lauten für die beiden Methoden:

Zwei pH:

$$N = \frac{F_{6A} - F_{3A}}{F_{6St} - F_{3St} - (F_{6A} - F_{3A})} \cdot K_N$$

A =

$$\frac{F_{3A} - F_B - 0,1(F_{6A} - F_{3A})}{F_{3St} - F_B - 0,1(F_{6St} - F_{3St}) - [F_{3A} - F_B - 0,1(F_{6A} - F_{3A})]} \cdot K_A$$

Zwei Filter:

$$N = \frac{q_A(F_{1A} - F_{1B}) - (F_{2A} - F_{2B})}{q_A(F_{1St} - F_{1A}) - (F_{2St} - F_{2A})} \cdot K_N$$

$$A = \frac{q_N(F_{1A} - F_{1B}) - (F_{2A} - F_{2B})}{q_N(F_{1St} - F_{1A}) - (F_{2St} - F_{2A})} \cdot K_A$$

$F_6$ : Fluoreszenz bei  $\text{pH} = 6$

$F_3$ : Fluoreszenz bei  $\text{pH} = 3$

$F_1$ : Fluoreszenz bei Filter 1

$F_2$ : Fluoreszenz bei Filter 2 (identisch mit  $F_1$ )

A: Urinprobe ohne Standardzusatz

St: Urinprobe mit Standardzusatz

B: Blindprobe mit zerstörtem Lutin

$K_N$  bzw.  $K_A$ : Noradrenalin bzw. Adrenalinkonzentration des Standards

$q_N$ : Quotient  $\frac{F_2}{F_1}$  für reines Noradrenalin  $\approx 3,6$  } auf Eppendorf  
mit den Filtern  
 $F_1$  366/313  $m\mu$   
 $q_A$ : Quotient  $\frac{F_2}{F_1}$  für reines Adrenalin  $\approx 1,8$  }  $F_2$  436/405  $m\mu$

Bei beiden Methoden werden Fluoreszenzdifferenzen von zwei verschieden behandelten Proben ( $F_{6A} - F_{3A}$ ) bzw. ( $F_{1A} - F_{1B}$ ) usw. für die Berechnung verwendet. Es besteht also für beide Methoden eine ähnliche Gefahr der Summierung von 2 Ablesefehlern.

Annahme: Fluoreszenz von Noradrenalin und Adrenalin sowohl im Urin als auch im zugesetzten Standard gleich stark; zugesetzte Menge für beide Katecholamine gleich groß, wie die im Urin schon vorhandene Menge.

$$F_{6A} - F_{3A} = 18 \text{ (angenommen)}$$

aus  $F_{6A} - F_{3A}$  berechnet:

$F_{6St} - F_{3St} = 36$	$F_{1A} - F_{1B} = 16,7$
$F_{3A} - F_B = 22$	$F_{1St} - F_{1A} = 16,7$
$F_{3St} - F_B = 44$	$F_{2A} - F_{2B} = 40$
	$F_{2St} - F_{2A} = 40$

Setzt man die Zahlen in obigen Formeln ein und rechnet mit einem Ablesefehler von + 1 Skalenteil entweder bei  $F_{3A}$  oder  $F_{6A}$  bzw. entweder bei  $F_{1A}$  oder bei  $F_{2A}$ , dann ergeben sich folgende Abweichungen vom richtigen Resultat:

*Zwei pH:* Noradrenalin; Fehler bei  $F_{6A}$ : Abweichung 12%  
 Fehler bei  $F_{3A}$ : Abweichung 10,5%  
 Adrenalin; Fehler bei  $F_{3A}$ : Abweichung 11,5%

*Zwei Filter:* Noradrenalin; Fehler bei  $F_{2A}$ : Abweichung 9,5%  
 Fehler bei  $F_{1A}$ : Abweichung 42,5%  
 Adrenalin; Fehler bei  $F_{2A}$ : Abweichung 22%  
 Fehler bei  $F_{1A}$ : Abweichung 31%

Ablesefehler der  $F_1$ -Fluoreszenz wirken sich bei der „Zwei-Filter-Methode“ verheerend aus, wegen der Multiplikation durch die Faktoren  $q_N$  bzw.  $q_A$ . Bei beliebigem Variieren der oben angenommenen Konzentrationsverhältnisse sind die durchschnittlichen Abweichungen bei gleichbleibenden Ablesefehlern bei der „Zwei-Filter-Methode“ stets mindestens doppelt so groß wie bei der

„Zwei-pH-Methode“. Bei Verwendung der beiden Primärwellenlängen 335 und 385  $m\mu$ , wie von RITZEL (5) vorgeschlagen, liegen die Verhältnisse für die „Zwei-Filter-Methode“ auch nicht günstiger.

### Normalbereich

Bei 10 gesunden Erwachsenen (5 Frauen und 5 Männer) wurde an je 3 fortlaufenden Tagen die Katecholamin-ausscheidung im Harn bestimmt. Als *Mittelwerte* der drei Bestimmungen wurden folgenden Zahlen erhalten:

		Noradrenalin $\mu\text{g}/24 \text{ Stdn.}$	Adrenalin $\mu\text{g}/24 \text{ Stdn.}$
Frauen	1.	172	16
	2.	211	33
	3.	133	36
	4.	155	5
	5.	134	26
Männer	6.	159	34
	7.	147	26
	8.	210	15
	9.	141	5
	10.	198	23

Mittel und Standardabweichung s: Noradrenalin  $166 \pm 31 \mu\text{g}/24 \text{ Stdn.}$ ; Adrenalin  $22 \pm 11 \mu\text{g}/24 \text{ Stdn.}$

Normalbereich (Mittel  $\pm 2s$ ): Noradrenalin 104—228  $\mu\text{g}/24 \text{ Stdn.}$ ; Adrenalin 0—44  $\mu\text{g}/24 \text{ Stdn.}$

Die Zahl der Versuchspersonen ist zu klein zur Aufstellung eines gültigen Normalbereiches. Eine Ausscheidung von weniger als 220  $\mu\text{g}$  Gesamt-Noradrenalin und weniger als 40  $\mu\text{g}$  Gesamt-Adrenalin dürfte aber als normal angesehen werden.

### Literatur

- VON EULER, U. S. und I. FLODING, Acta physiol. scand. 33, Suppl. 118, 45 (1955). — 2. NADEAU, G. und G. SOBOLEWSKI, J. Chromatogr. (Amsterdam) 6, 164 (1961). — 3. JACOBS, S. L., C. SOBEL und R. J. HENRY, J. clin. Endocr., Springfield 21, 305 (1961). — 4. PEKKARINEN, A. und M. E. PITKÄNEN, Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 7, 1 (1955). — 5. RITZEL, G. und W. A. HUNZINGER, Klin. Wschr. 41, 419 (1963).

Dr. chem. Konrad Lauber  
 Medizinisch-chemisches Institut  
 der Universität Bern  
 Bern/Schweiz, Bühlstr. 28