

**Aus dem Institut für Klinische Chemie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Komm. Leiter Prof. Dr. med. Dr. h.c. Dietrich Seidel**

**Standardisierung der klinisch-
chemischen Präanalytik von
harngängigen Markermolekülen und
Bestimmung von Katecholaminen
mittels on-line SPE-HPLC-ECD**

Dissertation

**zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

Rosa Morello

aus Bietigheim-Bissingen

Jahr

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Karl-Siegfried Boos

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Franz-Xaver Reichl
Prof. Dr. Walter Hofmann

Dekan: Prof. Dr. med Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 05. 2007

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Dr. Karl-Siegfried Boos ganz herzlich für die interessante und aktuelle Themenstellung, seine wissenschaftliche Anleitung, seine engagierte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und für die Möglichkeit die experimentellen Ergebnisse auf nationalen und internationalen Fachtagungen vor- und zur Diskussion zu stellen. Mit seiner steten Diskussionsbereitschaft förderte er meine Kreativität und ermöglichte mir die Verwirklichung der eigenen Ideen. Ganz besonders möchte ich mich auch für das mir stets entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Dietrich Seidel, Direktor des Instituts für Klinische Chemie, Klinikum der Universität München, Grosshadern, gilt mein Dank für seine wohlwollende Förderung und Unterstützung dieser Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Walter Sarstedt (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) und seinen Mitarbeitern Frau Dr. Dagmar Flach, Herrn Dr. Jochen Temper und Herrn Jochen Roller für deren Interesse an der Herstellung des UriSet 24 und die damit verbundenen anregenden Diskussionen.

Bei Herrn Dr. Patrice Chiap, Herrn Dr. Phillippe Hubert und dem Gastwissenschaftler Eric Rozet (University of Liège, Institute of Pharmacy, Dept. of Analytical Pharmaceutical Chemistry) möchte ich mich sehr herzlich für die angenehme und erfolgreiche Kooperation im Rahmen des EU-Forschungsprojekts "Validation of the transfer of analytical methods" bedanken.

Herrn Dr. Giovanni Maio (Dionex Softron GmbH, Germering) danke ich herzlich für sein Engagement im Rahmen unserer Kooperation.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Alfred Bauer (Recipe GmbH, München) sowie Herrn Dr. Norbert Dirsch und Herrn Dr. Stefan Ruppert für die Unterstützung bei der Durchführung der zahlreichen Messungen im firmeneigenen Labor bedanken.

Herrn Priv.- Doz. Dr. Michael Vogeser und seinem Laborteam danke ich für die gute Zusammenarbeit in unserem Institut.

Insbesondere möchte ich auch meinen Freunden und Kollegen im Arbeitskreis danken:

Maria Mezger, Jelena Milojkovic, Bas Teunissen, Eric Rozet, Dr. Dong-Ying Chen, Dr. Katrin Georgi, Dr. Veronika Eder, Dr. Claudia Fleischer, Dr. Stefan Bengsch, Dr. Ágnes Nyéki, Giuly Bringiotti und Theo Klein für das angenehme Arbeitsklima im Labor und für die vielen fachlichen und nichtfachlichen Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern Angela und Antonio Langella, meinen Geschwistern Angela und Manuela sowie meinem Mann Calogero, die immer für mich da waren, wenn ich sie gebraucht habe, und die mich stets unterstützt haben.

Gewidmet in großer Dankbarkeit

meinen Eltern Angela und Antonio

und

meinem lieben Gero

***Du kannst Malen Dein Leben,
welche Farben Du wählst liegt an Dir.***

Calogero Morello

Inhaltsverzeichnis

<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>11</u>
<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>16</u>
<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>17</u>
<u>1 EINLEITUNG.....</u>	<u>21</u>
1.1 Problemstellung	21
1.2 Ziel der Arbeit	23
<u>2 UNTERSUCHTE MARKERMOLEKÜLE</u>	<u>24</u>
2.1 Katecholamine.....	24
2.1.1 Biochemie	25
2.1.1.1 Chemische Struktur	25
2.1.2 Diagnostische Relevanz.....	31
2.1.3 Präanalytik	38
2.2 Metanephrin und Normetanephrin.....	43
2.2.1 Biochemie	43
2.2.1.1 Chemische Struktur	43
2.2.2 Diagnostische Relevanz.....	44
2.2.3 Präanalytik	47
2.3 Vanillinmandelsäure und Homovanillinsäure.....	49
2.3.1 Biochemie	49
2.3.1.1 Chemische Struktur	49
2.3.2 Diagnostische Relevanz.....	50
2.3.3 Präanalytik	52
2.4 Serotonin und 5-Hydroxyindolessigsäure	56
2.4.1 Biochemie	56

2.4.1.1	Funktion und chemische Struktur	56
2.4.2	Diagnostische Relevanz.....	60
2.4.3	Präanalytik	62
3	<u>SAMMLUNG VON 24h-URIN : LITERATURRECHERCHE.....</u>	67
3.1	Vorgehensweise.....	67
3.2	Sammelgefäß.....	68
3.2.1	Volumen	68
3.2.2	Material.....	68
3.2.3	Stabilisierungsreagenz	69
3.2.4	Beschriftung	69
3.2.5	Transport, Lagerung und Entsorgung	70
3.2.6	Gebrauchsanweisung	70
4	<u>PROBENAUFBEREITUNG FÜR DIE BIOANALYTISCHE HPLC</u>	71
4.1	Urin als Probenmatrix.....	71
4.1.1	Zusammensetzung	72
4.1.2	Bezugsgröße Kreatinin	76
4.1.3	Anforderungen an die Probenaufbereitung	78
4.2	Verfahren für die Aufbereitung biologischer Flüssigkeiten	79
4.2.1	Flüssig-Flüssig Extraktion.....	80
4.2.2	Filtration / Dialyse.....	81
4.2.3	Proteinpräzipitation	82
4.2.4	Größenausschlusschromatographie	82
4.3	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE).....	83
4.3.1	Kriterien für eine optimale extraktive Probenaufbereitung.....	84
4.3.2	Automation und Kopplung der SPE.....	84
4.3.3	Automation durch „Roboter“ (at-line SPE)	85
4.3.4	Automation durch apparative Integration (on-line SPE)	86
4.4	Maßgeschneiderte SPE-Materialien.....	89
4.4.1	Definition.....	89
4.4.2	Eigenschaften und Systematik von Restricted Access Materialien (RAM).....	90
5	<u>MODERNE METHODEN ZUR BESTIMMUNG VON KATECHOLAMINEN IN URIN</u>	94
5.1	Probenaufbereitung.....	95

5.1.1	Off-line Probenaufbereitung	96
5.1.2	On-line Probenaufbereitung	99
5.1.2.1	Systeminterne Probenaufbereitung an Aluminiumoxid	99
5.1.2.2	Systeminterne Probenaufbereitung an Phenylboronsäure	100
5.1.2.3	Systeminterne Probenaufbereitung an RP-18 Phasen mit Ionenpaarreagenz	102
5.2	Trennverfahren (HPLC)	103
5.2.1	Detektionsverfahren	104
5.2.1.1	Fluoreszenz Detektion (FD)	105
5.2.1.2	Elektrochemische Detektion (ECD)	109
5.2.1.3	Massenspektrometrische Detektion (MS)	111
5.3	Weitere analytische Methoden zur Bestimmung der Katecholamine im Urin	112
5.3.1	Immunoassays	112
5.3.2	Kapillarelektrophorese (CE)	113
5.3.3	Fluorimetrische Methoden	114
6	EXPERIMENTELLER TEIL MIT DISKUSSION	115
6.1	Präanalytik harngängiger Markermoleküle	115
6.1.1	Stabilität	116
6.1.1.1	pH-Shift	116
6.1.1.2	Wiederfindung der Katecholamine in Abhängigkeit von der Zeit und pH	125
6.1.1.3	Wiederfindung der übrigen Markermoleküle	130
6.1.1.4	Ansäuerung des 24h-Urins	132
6.1.2	Partikuläre, säurebindende Adsorbermaterialien	133
6.1.2.1	Anforderungen	133
6.1.2.2	Auswahl und Struktur	134
6.1.2.3	Adsorptionsverhalten	136
6.1.2.4	Überprüfung auf potentielle Interferenzen	138
6.1.2.5	Überprüfung der Wiederfindung bei Verwendung des Hydrogel B	146
6.1.2.6	Ermittlung der benötigten Molmenge an Salzsäure bei Verwendung von Hydrogel B	148
6.1.3	Zusatz von Salzsäure	151
6.1.3.1	pH-Wert Bereich	151
6.1.3.2	Konzentration der Salzsäure	152
6.1.3.3	Molmenge der Salzsäure pro 24h-Sammelurin	152
6.1.4	Volumen des 24h-Sammelurins	156
6.1.5	Lichtschutz	157

6.1.6	Kommerziell erhältliche Behälter für die Sammlung von 24h-Urin.....	159
6.1.7	24h-Urin Sammelkit: UriSet 24	162
6.1.7.1	Komponenten des UriSet 24.....	163
6.1.8	Einführung des UriSet 24.....	167
6.1.9	UriSet 24: Anwendungsbeobachtung.....	168
6.2	Analytik der Katecholamine	171
6.2.1	Entwicklung eines automatisierten HPLC Analyseverfahrens für Katecholamine in Urin mit integrierter Probenaufbereitung und elektrochemischer Detektion (ECD).....	171
6.2.1.1	Apparativer Aufbau eines Zwei-Säulen HPLC-Systems.....	172
6.2.1.2	Allgemeine Vorgehensweise am Beispiel der Antimykotika	173
6.2.2	Entwicklung einer on-line SPE-HPLC-ECD Methode zur Bestimmung von Katecholaminen in Humanurin	194
6.2.2.2	Systemaufbau	197
6.2.2.3	Abtrennung der Urinmatrix (t_M)	202
6.2.2.4	Elutionsprofil der untersuchten Katecholamine (t_A).....	203
6.2.2.5	Transfer der untersuchten Katecholamine (t_T).....	204
6.2.2.6	Temporäre Ausblendung der mobilen Phase (t_{HC})	205
6.2.2.7	Berechnung der Ventilschaltzeiten	206
6.2.2.8	Analysenzyklus.....	208
6.2.3	Validierung.....	211
7	<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	212
8	<u>ALLGEMEINE EXPERIMENTELLE ANGABEN.....</u>	216
8.1	Geräte und Materialien	216
8.2	Chemikalien und Lösemittel.....	218
9	<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	221
	<u>VERÖFFENTLICHUNGEN, POSTERBEITRÄGE, WORKSHOPS, SEMINARE UND VORTRÄGE IM ZUSAMMENHANG MIT DER VORLIEGENDEN ARBEIT:</u>	245
	<u>LEBENS LAUF</u>	253

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Teilschritte der präanalytischen Phase	22
Abbildung 2: Dopamin (DA).....	25
Abbildung 3: Noradrenalin (NA).....	25
Abbildung 4: Adrenalin (A).....	25
Abbildung 5: Syntheseweg der Katecholamine	27
Abbildung 6: Abbau des Dopamins	29
Abbildung 7: Abbau von Noradrenalin und Adrenalin	30
Abbildung 8: Stressbedingter Anstieg der Konzentrationen von Noradrenalin und Adrenalin im Blut	33
Abbildung 9: 4-O-Sulfo-konjugierte(a) und 3-O-Glucuronsäure-konjugierte (b) Katecholamine	36
Abbildung 10: Metanephrin (ME).....	43
Abbildung 11: Normetanephrin (NME).....	43
Abbildung 12: Homovanillinsäure (HVS)	49
Abbildung 13: Vanillinmandelsäure (VMS)	49
Abbildung 14: Serotonin (Sero), 5-Hydroxytryptamin (5-HT).....	57
Abbildung 15: 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIES).....	57
Abbildung 16: Biosynthese und Abbau von Serotonin.....	59
Abbildung 17: Zusammensetzung des menschlichen Urins	75
Abbildung 18: Zusammensetzung des menschlichen Urins	76
Abbildung 19: Aufbereitung biologischer Flüssigkeiten	80
Abbildung 20: Verfahrenstechnik der Festphasenextraktion: „off-line“	83
Abbildung 21: Modi operandi der Festphasenextraktion: „at-line“ und „on-line“	85
Abbildung 22: Schematische Darstellung eines „Restricted Access“-Adsorbens ...	91
Abbildung 23: Klassifikation der „Restricted Access“ Materialien	92
Abbildung 24: Analyseschritte für die Bestimmung der Katecholamine mittels off-line SPE (Kombination aus Ionenaustausch- und Adsorptionschromatographie)	97

Abbildung 25: Analyseschritte für die Bestimmung der Katecholamine mittels off-line SPE (Affinitätschromatographie)	98
Abbildung 26: Reaktionen zur Vorsäulenderivatisierung der Katecholamine	106
Abbildung 27: Generierung der Trihydroxyindole	107
Abbildung 28: Anodische Oxidation der Katecholamine zu den entsprechenden Chinonen.....	110
Abbildung 29: Prozentuale pH-Wert Verteilung von insgesamt 1458 Spontanurinproben.....	117
Abbildung 30: Zeitabhängige pH-Veränderung in titrierten 24h-Sammelurin-Poolproben bei Raumtemperatur	118
Abbildung 31: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin-Pool.....	119
Abbildung 32: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 1.....	120
Abbildung 33: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 2.....	120
Abbildung 34: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 3.....	121
Abbildung 35: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 4.....	121
Abbildung 36: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 5.....	122
Abbildung 37: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 6.....	122
Abbildung 38: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 7.....	123
Abbildung 39: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 8.....	123
Abbildung 40: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 9.....	124
Abbildung 41: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 10.....	124
Abbildung 42: Wiederfindung [%] von Dopamin	126
Abbildung 43: Wiederfindung [%] von Adrenalin	127
Abbildung 44: Wiederfindung [%] von Noradrenalin.....	127
Abbildung 45: Zeitabhängiger Verlauf des pH-Wertes in gepoolten, nativen 24h-Sammelurinen bei 21°C	128
Abbildung 46: Wiederfindung der Katecholamine [%] über 7 Tage.	129
Abbildung 47: Wiederfindung [%] der Metanephrine über 7 Tage	130
Abbildung 48: Wiederfindung [%] der Vanillinmandelsäure und der Homovanillinsäure über 7 Tage	131
Abbildung 49: Wiederfindung [%] der 5-Hydroxyindolessigsäure über 7 Tage.....	131
Abbildung 50: Poly-(acrylsäure) Natriumsalz- propf-poly-(ethylenoxid).....	134
Abbildung 51: Poly-(acrylsäure-co-acrylsäureamid) Kaliumsalz.....	135

Abbildung 52: Benötigte Mindestmenge an Hydrogel A	137
Abbildung 53: Benötigte Mindestmenge an Hydrogel B	137
Abbildung 54: Benötigte Mindestmenge an Hydrogel C	138
Abbildung 55: Chromatogramme einer mit den untersuchten Katecholaminen aufgestockten Probe eines 24h-Sammelurins	140
Abbildung 56: Chromatogramme einer mit Normetanephrin, Metanephrin und internem Standard dotierten Probe eines 24h-Sammelurins.....	141
Abbildung 57: Chromatogramme einer mit Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure, 5-Hydroxyindolessigsäure und internem Standard dotierten Probe eines 24h-Sammelurins.....	143
Abbildung 58: Chromatogramme einer mit Serotonin und internem Standard dotierten Probe eines 24h-Sammelurins	144
Abbildung 59: Chromatogramme einer mit Hydroxyprolin und internem Standard dotierten Probe eines 24h-Sammelurins	145
Abbildung 60: Stabilität und Wiederfindung (n=3) der Katecholamine bei Raumtemperatur in einem dotierten 24h-Sammelurin.....	146
Abbildung 61: Wiederfindung (WF) leicht oxidierbarer, endogener Verbindungen in einer repräsentativen Probe eines 24h-Sammelurins.....	147
Abbildung 62: Verteilung der Kreatininwerte um den Richtwert.....	148
Abbildung 63: Überprüfung der Vollständigkeit der 24h- Urinsammlung über die Kreatininausscheidung	149
Abbildung 64: Volumenverteilung von 24h-Sammelurinen	149
Abbildung 65: pH-Wert der 24h-Sammelurine bei Vorlage von Salzsäure-haltigem Hydrogel B	150
Abbildung 66: pH-Wert der 24h-Sammelurine nach Vorlage von Hydrogel B	150
Abbildung 67: Native 24h-Sammelurine: Verteilung (Boxplot) des pH-Werts	153
Abbildung 68: Native 24h-Sammelurine: Verteilung (Boxplot) der ermittelten Kreatininwerte	153
Abbildung 69: Native 24h-Sammelurine: Zusammensetzung der weiblichen und männlichen Probanden nach aufsteigendem Alter	154
Abbildung 70: 24h-Sammelurin: Boxplot der Volumenverteilung von 60 weiblichen und männlichen Probanden	155
Abbildung 71: Native 24h-Sammelurine (n=60): Verteilung (Boxplots) der benötigten Stoffmenge an HCl um einen bestimmten pH-Wert zu erreichen...	155
Abbildung 72: 24h-Sammelurine: Boxplot der Volumenverteilung von 120 männlichen und weiblichen Probanden	156

Abbildung 73: Wiederfindung (Stabilität) von Katecholaminen (Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin) bei Lagerung (Raumtemperatur) von 24h-Urin ohne Lichtschutz	158
Abbildung 74: Wiederfindung (Stabilität) von Katecholaminen (Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin) bei Lagerung (Raumtemperatur) von 24h-Urin unter Lichtschutz	158
Abbildung 75: Beispiele für Urin-Sammelgefäße	159
Abbildung 76: Beispiel a) Gebrauchsanweisung	160
Abbildung 77: Beispiel b) Gebrauchsanweisung	161
Abbildung 78: UriSet 24: Aufriß-Darstellung	162
Abbildung 79: Komponenten des UriSet 24	163
Abbildung 80: Beispiel des in deutscher Sprache verfassten Gebrauchshinweises für das Sammeln eines 24h-Urins mit dem UriSet 24	166
Abbildung 81: Anwendungsstudie: Kreatininwerte der 50 Patienten	168
Abbildung 82: Boxplot der Volumenverteilung der 24h-Sammelurine von 50 Patienten.	169
Abbildung 83: Boxplot der Verteilung der pH-Werte der 24h-Sammelurine von 50 Patienten	170
Abbildung 84: Apparativer Aufbau eines gekoppelten Zwei-Säulen HPLC-Systems... ..	172
Abbildung 85: Chemische Strukturformeln der Modell-Analyten	174
Abbildung 86: Systemaufbau zur Bestimmung von t_M und t_A	175
Abbildung 87: Elutionsprofil der Probenmatrix (t_M)	176
Abbildung 88: Elutionsprofil des Analyten (t_A)	177
Abbildung 89: Systemaufbau zur Bestimmung von t_T	178
Abbildung 90: Transfer des apolaren Analyten Itraconazol	179
Abbildung 91: Systemaufbau zur Bestimmung von t_{HC}	180
Abbildung 92: Berechnung der Ventilschaltzeiten t_{v1} und t_{v2}	182
Abbildung 93: Optimierung des Transferschritts durch Thermo-Desorption oder In-line Verdünnung	187
Abbildung 94: Chromatogramm einer on-line SPE-HPLC-UV	188
Abbildung 95: Memory-Effekt (vorhanden)	189
Abbildung 96: Memory-Effekt (nicht vorhanden)	190
Abbildung 97: Analyseschema für die on-line SPE-HPLC-UV Bestimmung	191

Abbildung 98: On-line SPE-HPLC-UV Bestimmung von Itraconazol und 1-OH-Itraconazol.....	192
Abbildung 99: On-line SPE-HPLC-UV Bestimmung von Voriconazol, Itraconazol und 1-OH-Itraconazol.	192
Abbildung 100: Vorgehensweise bei der Methodenentwicklung.....	193
Abbildung 101: Funktionsweise der affinitätschromatographischen (AC) und größenausschlusschromatographischen (SEC) on-line Festphasenextraktion (SPE) von cis-Diol Verbindungen.....	195
Abbildung 102: Instrumenteller Aufbau des on-line SPE-HPLC-ECD Systems: A).....	199
Abbildung 103: Instrumenteller Aufbau des on-line SPE-HPLC-ECD Systems: B).....	200
Abbildung 104: Instrumenteller Aufbau des on-line SPE-HPLC-ECD Systems: C).....	200
Abbildung 105: Instrumenteller Aufbau des on-line SPE-HPLC-ECD Systems: D).....	201
Abbildung 106: Bestimmung des Parameters t_M :	202
Abbildung 107: Bestimmung des Parameters t_A :	203
Abbildung 108: Bestimmung des Parameters t_T :	204
Abbildung 109: Bestimmung des Parameters t_{HC} :	206
Abbildung 110: Zeitliche Abfolge der Verfahrensschritte der on-line SPE-HPLC-ECD Analysemethode	208
Abbildung 111: On-line SPE-HPLC-ECD: Repräsentatives Chromatogramm.....	210

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Untersuchte Markermoleküle	24
Tabelle 2: Molekulargewicht und pK_s -Werte der Katecholamine.....	26
Tabelle 3: Katecholaminspiegel im Blut.....	32
Tabelle 4: Normalbereiche der freien Katecholamine im Urin	37
Tabelle 5: Normalbereiche der Katecholamine im Plasma	38
Tabelle 6: Molmenge an vorgelegter Salzsäure bei der Gewinnung von 24h-Urin	40
Tabelle 7: Referenzwerte der Metanephine im Urin	46
Tabelle 8: Referenzwerte der Metanephine im Plasma	46
Tabelle 9: Referenzwerte der Vanillinmandelsäure (VMS) und der Homovanillinsäure (HVS) im 24h-Urin bei Erwachsenen	51
Tabelle 10: Referenzwerte der Vanillinmandelsäure (VMS) und der Homovanillinsäure (HVS) im Urin bei Kindern	51
Tabelle 11: Referenzbereich Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT)	61
Tabelle 12: Referenzbereich 5-HIES	62
Tabelle 13: Ausgewählte Urinbestandteile und durchschnittliche tägliche Zusammensetzung	72
Tabelle 14: Kreatinin-Ausscheidungswerte für Erwachsene.....	77
Tabelle 15: Arbeitsweisen	88
Tabelle 16: Aufbau, Typ und chromatographische Trennprozesse verschiedener RAM-SPE-Säulen.....	93
Tabelle 17: Probenaufbereitungstechniken für die Katecholaminanalytik:.....	95
Tabelle 18: Durchschnittswerte der Konzentration der untersuchten Katecholamine im einem nativen und in einem aufgestockten 24h-Sammelurin- Pool.....	125
Tabelle 19: On-line SPE-HPLC-ECD: Analyseprogramm.....	209

Abkürzungsverzeichnis

A	Adrenalin
AC	Affinitätschromatographie
ACN	Acetonitril
ADS	Alkyl Diol Silica
API	Atmospheric Pressure Ionisation Source
BA	Benzylamin
°C	Grad Celsius
CE	Kapillarelektrophorese
COMT	Catecholamin-O-Methyltransferase
Da	Dalton
DA	Dopamin
DHBA	Dihydroxybenzylamin
DNS-Cl	Dansylchlorid
DPE	1,2-Diphenylethyldiamin
EC	Elektrochemische Zelle
ECD	Elektrochemischer Detektor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymelinked Immuno Sorbent Assay
FD	Fluoreszenzdetektion
GFC	Gelfiltrationschromatographie

GLP	Good Laboratory Praxis
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HIES	5-Hydroxyindolessigsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HMBA	Hydroxymethylbenzylamin
5-HT	5-Hydroxytryptamin
HVS	Homovanillinsäure
HYP	Hydroxyprolin
ID	Innendurchmesser
IEX	Ionenaustauschchromatographie
IS	Interner Standard
k. A.	keine Angaben
kg	Kilogramm(10^3 g)
L	Liter (10^3 mL)
LC	Flüssigchromatographie
M	männlich
ME	Metanephrin
MeOH	Methanol
mg	Milligramm (10^{-3} g)
min	Minute
mL	Milliliter (10^{-3} L)
mm	Millimeter (10^{-3} m)

MS	Massenspektrometer
mV	Millivolt (10^{-3} V)
n	Anzahl der Probanden
nA	Nanoampere (10^{-9} A)
NA	Noradrenalin
nm	Nanometer (10^{-9} m)
NME	Normetanephrin
OPA	ortho-Phthalaldehyd
PBA	Phenylboronsäure (Phenylboronic acid)
pH	pH-Wert
pg	Pikogramm (10^{-12} g)
ppb	10^{-9} Teile pro Milliarde (parts per billion)
ppt	10^{-12} Teile pro Billion (parts per trillion)
RA	Restricted Access
RAM	Restricted Access Material
RP	Umkehrphase (Reversed Phase)
RPC	Umkehrphasenchromatographie
RT	Raumtemperatur
SEC	Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography)
SER	Serotonin
SPE	Festphasenextraktion (Solid-Phase-Extraktion)
SV	Schaltventil
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring

Abkürzungsverzeichnis

THI	Trihydroxyindol
μg	Mikrogramm (10^{-6} g)
μL	Mikroliter (10^{-6} L)
μm	Mikrometer (10^{-6} m)
UV	Ultraviolett
VMS	Vanillinmandelsäure
v/v	Volumenanteil
w	Weiblich
λ	Wellenlänge
%	Prozent

1. EINLEITUNG

1.1 Problemstellung

Eine Grundvoraussetzung klinisch-chemischer Untersuchungen ist, dass der zum Zeitpunkt der Probengewinnung in einer Körperflüssigkeit vorhandene Wert eines diagnostischen Messparameters bei der nachfolgenden Analyse unverfälscht erhalten wird. Das heißt, die Konzentration des Analyten *in-vivo* soll der Konzentration des Analyten *in-vitro* entsprechen. Aus diesem Grund besitzt die präanalytische Phase, d.h. die Zeitspanne zwischen Probenahme und Quantifizierung einen hohen Stellenwert hinsichtlich der analytischen und diagnostischen Qualität. Dies gilt insbesondere für instabile Analyte, die beispielsweise über einen längeren Zeitraum mit dem Urin ausgeschieden werden. Derartige harngängige Markermoleküle sind die Katecholamine Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin sowie deren Metabolite Normetanephrin, Metanephrin, Vanillinmandelsäure und Homovanillinsäure. Darüber hinaus besitzen das renal ausgeschiedene Serotonin als ein Abbauprodukt des Tryptophans und 5-Hydroxyindolessigsäure als Metabolit des Serotonins diagnostische Aussagekraft. Für diese Analyten wurde bislang kein einheitliches Standardverfahren bezüglich deren Gewinnung und Stabilisierung im Urin, sowie deren Transport und Lagerung beschrieben. Dies betrifft vor allem die leicht oxidierbaren Katecholamine.

Derzeit wird der für eine aussagekräftige Katecholamin-Analytik benötigte 24h-Sammelurin während oder erst nach der Gewinnung auf unterschiedliche pH-Werte mit unterschiedlichen Säuren eingestellt, bei unterschiedlichen Temperaturen gesammelt und gelagert sowie nach unterschiedlichen - als maximal ermittelten - Zeitspannen analysiert.

Diese unterschiedlichen und zum größten Teil inadäquaten Verfahrensweisen bei der Präanalytik von harngängigen Markermolekülen insbesondere bezüglich der

Katecholamine führen nicht nur zu unterschiedlichen, sondern auch zu falschen Ergebnissen, die klinisch relevante Fehleinschätzungen zur Folge haben können. Selbst in den European Urinalysis Guidelines [156] ist kein standardisiertes Verfahren aufgeführt.

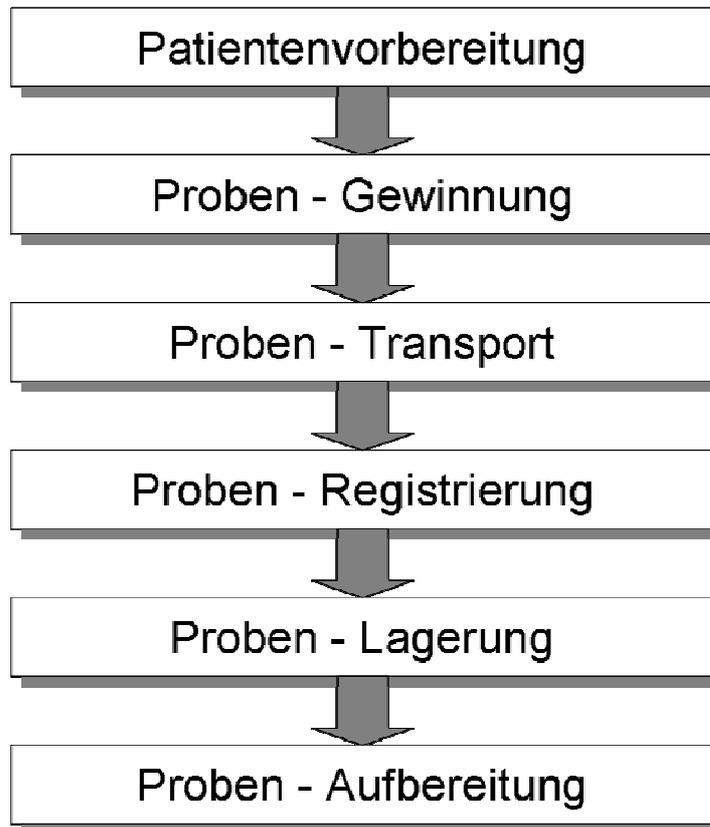


Abbildung 1: Teilschritte der präanalytischen Phase

An die Gewinnung bzw. den Transport der harngängigen Markermoleküle schließt sich eine entsprechende Probenaufbereitung an (Abbildung 1). Diese besteht oftmals aus vielen manuellen Schritten die fehlerträchtig, zeitaufwendig und kostenintensiv sind. Dies gilt wiederum insbesondere für die Extraktion der Katecholamine aus der komplexen Urinmatrix.

Eine effektive diagnostische Strategie der 24h-Urinalyse zur Erkennung, Differenzierung, Verlaufs- und Therapiebeurteilung von Erkrankungen erfordert neben einer standardisierten Präanalytik auch eine ausgereifte und möglichst vollautomatisierte Analytik.

1.2 Ziel der Arbeit

Ziel der Promotionsarbeit war die Entwicklung und klinische Erprobung eines neuen, standardisierten Verfahrens bzw. eines entsprechenden Sammelgefäßes für eine patientenfreundliche und analysengerechte Sammlung des 24h-Urins.

Hierbei sollte insbesondere erreicht werden, dass die untersuchten harngängigen Markermoleküle (Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin, Metanephrin, Normetanephrin, Homovanillinsäure, Vanillinmandelsäure, Serotonin und 5-Hydroxyindolessigsäure) während der Gewinnung und des Transports sowie der anschließenden Lagerung bis zur Analyse stabil bleiben.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in dem instrumentellen Aufbau, der Optimierung und Validierung eines vollautomatischen, routinetauglichen Zwei-Säulen HPLC-Analyseverfahrens zur Bestimmung der untersuchten Katecholamine direkt aus der hochkomplexen Urinmatrix. Hierbei sollte erstmalig ein – für die untersuchten Katecholamine sehr selektiver und sehr sensitiver – elektrochemischer Detektor in ein on-line Säulenschaltssystem integriert und störungsfrei betrieben werden.

2 UNTERSUCHTE MARKERMOLEKÜLE

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die nachstehenden, harngängigen Markermoleküle untersucht, die in der klinisch-chemischen Diagnostik eine wichtige Rolle spielen.

Tabelle 1: Untersuchte Markermoleküle

- Noradrenalin
- Normetanephrin
- Vanillinmandelsäure
- Serotonin
- Adrenalin
- Metanephrin
- Homovanillinsäure
- 5-Hydroxyindol-essigsäure
- Dopamin

Im Folgenden wird auf jeden einzelnen Analyten näher eingegangen hinsichtlich dessen Biochemie, diagnostische Relevanz und Präanalytik.

2.1 Katecholamine

Die Katecholamine gehören zu der Klasse der biogenen Amine. Diese Biomoleküle fungieren zum einen als Neurotransmitter bei der Regulation tierischen und menschlichen Verhaltens und zum anderen als steuernde Hormone bei katabolen und anabolen Stoffwechselprozessen.

2.1.1 Biochemie

2.1.1.1 Chemische Struktur

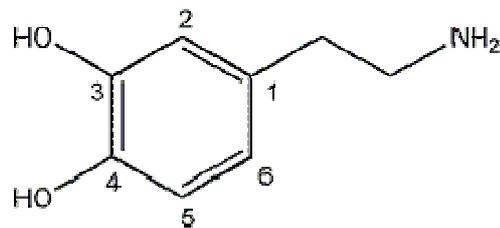


Abbildung 2: 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-ethylamin, Dopamin (DA)

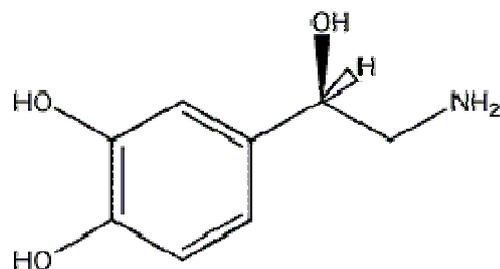


Abbildung 3: R-(-)-1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-aminoethanol, Noradrenalin (NA)

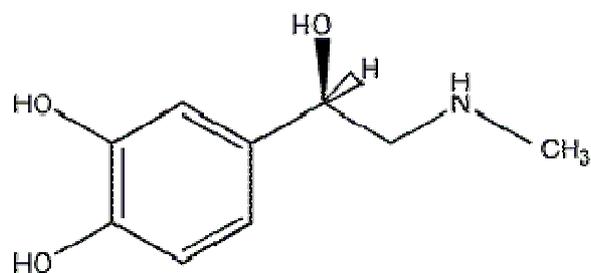


Abbildung 4: R-(-)-1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-(methylamino)-ethanol, Adrenalin (A)

Die chemische Struktur der Katecholamine leitet sich vom Brenzcatechin (1,2-Dihydroxybenzol, Catechol) ab. Dopamin und Noradrenalin enthalten eine primäre basische Aminfunktion, Adrenalin dagegen eine sekundäre. Die aufgeführten Katecholamine besitzen mit der cis-diol Gruppe eine gemeinsame Substruktur. Die pK_s -Werte und Molekulargewichte sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Molekulargewicht und pK_s -Werte der Katecholamine

	Dopamin	Noradrenalin	Adrenalin
pK_s	8.93	8.58	8.55
M_r	153.18	169.20	183.20

2.1.1.1 Biosynthese

Synthetisiert werden die Katecholamine von katecholaminergen Neuronen im Zentralnervensystem (ZNS), vom chromaffinen Gewebe im Nebennierenmark (NNM) und von sympathischen, postganglionären Neuronen.

Die Biosynthese der Katecholamine geht von der aromatischen Aminosäure L-Tyrosin aus, welche die Blut-Hirnschranke passieren kann und aktiv aus der Blutbahn in die Neuronen transportiert wird. Bis zum Noradrenalin hin ist der Syntheseweg im Nebennierenmark und in postganglionären Nervenzellen identisch. Das Tyrosin wird von dem Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) unter Beteiligung des Coenzym Tetrahydrobiopterin, zweiwertigen Eisen und Sauerstoff in der meta-Position zum 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) hydroxyliert. Das bei der Reaktion entstehende Dihydrobiopterin wird mit NADPH/H⁺ reoxidiert. Dihydroxyphenylalanin wird in einem zweiten, enzymatisch katalysierten Reaktionsschritt von der im Cytosol lokalisierten aromatischen L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) (L-DOPA-Decarboxylase) zu 3,4-Dihydroxyphenylethylamin (Dopamin) decarboxyliert. Durch

einen spezifischen Carrier wird Dopamin in die chromaffine Granula des Nebennierenmarks bzw. der postganglionären Neuronen aufgenommen. Durch die Dopamin- β -Hydroxylase (DBH), die als Cofaktoren zweiwertiges Kupfer und Ascorbinsäure benötigt [2], wird das Dopamin am β -C-Atom der Seitenkette zum Noradrenalin (3,4-Dihydroxyphenyl-ethanolamin) hydroxyliert. Die Phenylethanolamin-N-Methyltransferase (PNMT), die nur in adrenergen Neuronen des Zentralnervensystems und im Nebennierenmark zu finden ist, methyliert die terminale Aminogruppe des Noradrenalins. Als Methylgruppendonator fungiert bei der Biosynthese des Adrenalins das S-Adenosylmethionin (SAM), welches im Verlauf der Katalyse zu S-Adenosylhomocystein (SAH) demethyliert wird. Die jeweiligen Endprodukte der Katecholaminbiosynthese – Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin – werden in synaptischen Vesikeln gespeichert.

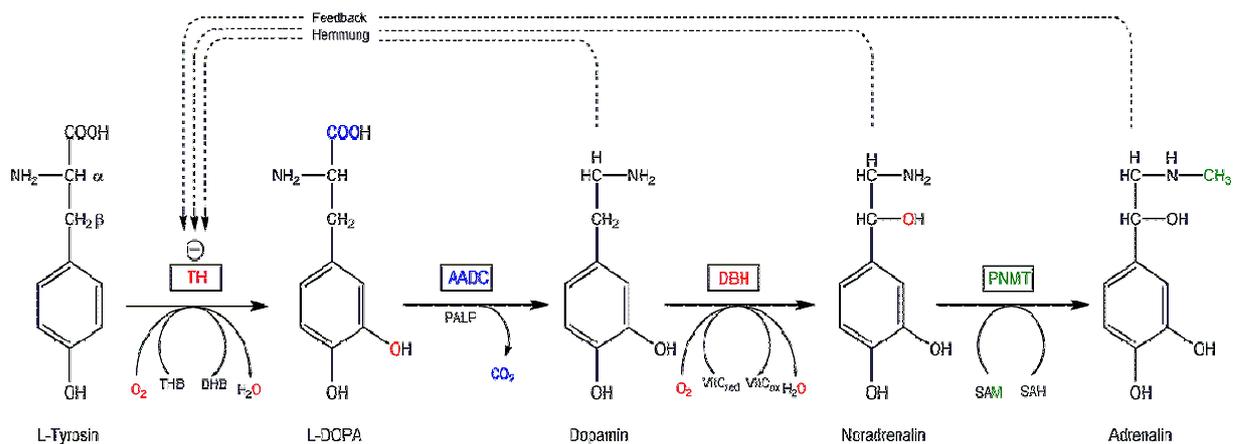


Abbildung 5: Syntheseweg der Katecholamine

Die Katecholaminbiosynthese wird im Organismus durch verschiedene Enzyme sehr genau reguliert. Das erste Enzym der Synthesekette, die L-Tyrosinhydroxylase, wird durch die jeweiligen Endprodukte Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin in ihrer Aktivität gehemmt („negatives Feedback“ / allosterische Hemmung). Hierdurch kann die Syntheserate der Neurotransmitter kurzzeitig dem Katecholaminbedarf angepasst werden. Eine erhöhte neurale Aktivität, über nicotinische Acetylcholinrezeptoren vermittelte Impulse, führt zur Transmitterfreisetzung durch Exocytose, die Katecholaminkonzentration der Neuronen sinkt, und es kommt zu einer erhöhten Katecholaminsyntheseleistung.

Bei andauernder neuraler Aktivität ist eine Langzeitregulation durch Induktion der de novo Synthese der Tyrosinhydroxylase und der Dopamin- β -Hydroxylase möglich. Glucocorticoide sind schwache Induktoren der Tyrosinhydroxylase und starke bezüglich der im Nebennierenmark vorkommenden Phenylethanolamin-N-Methyltransferase. Die Phenylethanolamin-N-Methyltransferase wird ebenfalls durch Noradrenalin und Adrenalin allosterisch gehemmt und bildet so ein weiteres Regulationsglied in der Synthesekette der Katecholamine.

2.1.1.1.2 Abbau der Katecholamine

Der Abbau der Katecholamine erfolgt durch die Monoaminoxidase (MAO) und die Katechol-O-Methyltransferase (COMT). Die in der äußeren Mitochondrienmembran der Neuronen lokalisierte Monoaminoxidase desaminiert die Katecholamine oxidativ zu den entsprechenden Aldehyden (Dopamin zu 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd; Noradrenalin und Adrenalin zu 3,4-Dihydroxymandelsäurealdehyd). Der durch den Abbau des Dopamins gebildete 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd wird von der Aldehyddehydrogenase (AldDH) zur 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure oxidiert und schließlich durch die Katechol-O-Methyltransferase an der 3-Position zum Hauptabbauprodukt des Dopamins, der Homovanillinsäure (3-Methoxy-4-hydroxyphenylelessigsäure) methyliert (Abbildung 6).

Der durch die oxidative Desaminierung von Noradrenalin und Adrenalin gebildete 3,4-Dihydroxymandelsäurealdehyd wird seinerseits von der Aldehydreduktase zu 3,4-Dihydroxyphenylglykol reduziert und anschließend durch die Katechol-O-Methyltransferase zum 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglykol (MHPG) methyliert. Aus dem ZNS gelangen nur die Abbauprodukte Homovanillinsäure (HVS) und 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglykol (MHPG) über die Blutbahn in die Nieren und werden renal ausgeschieden (Abbildung 7).

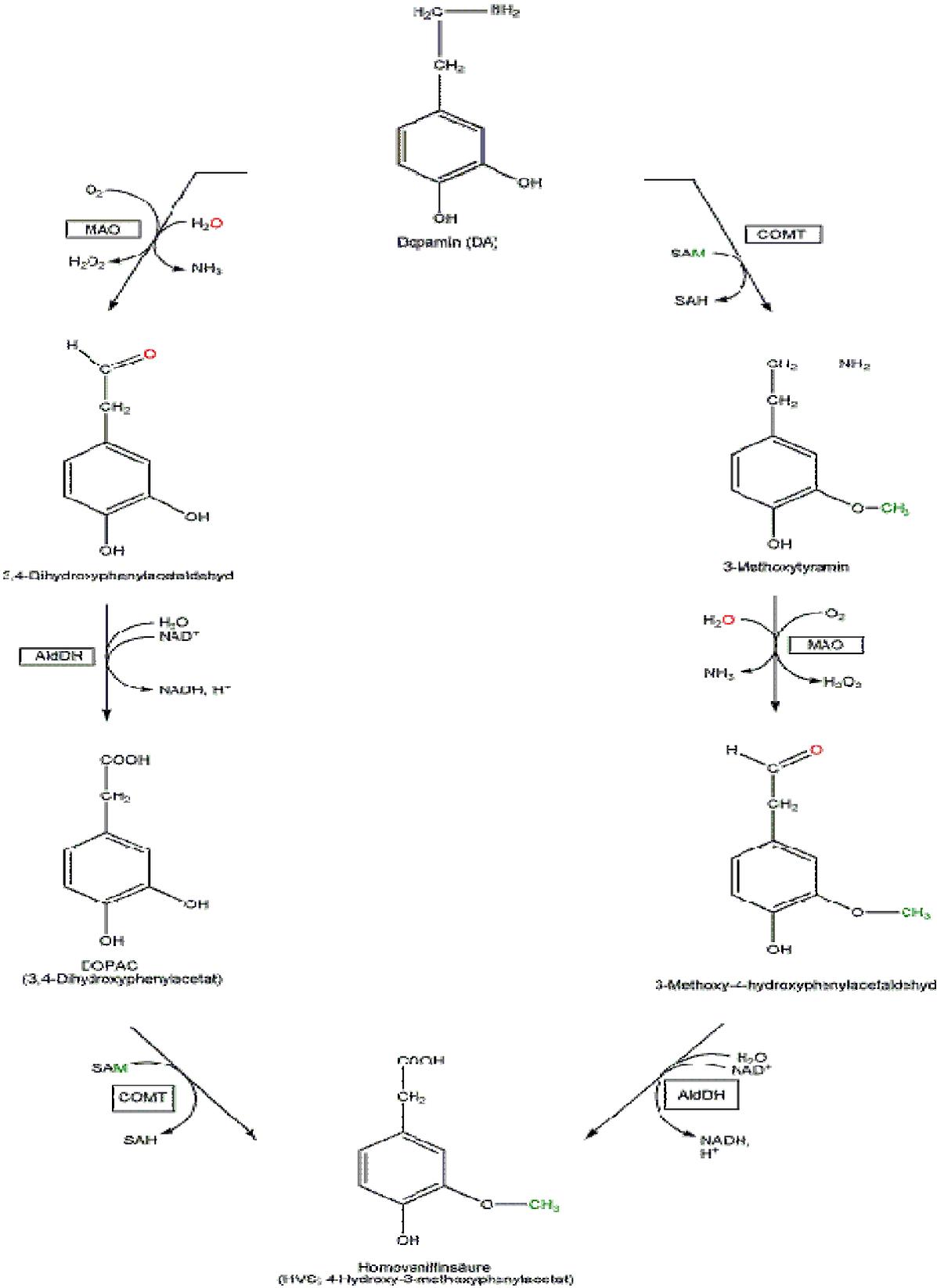


Abbildung 6: Abbau des Dopamins

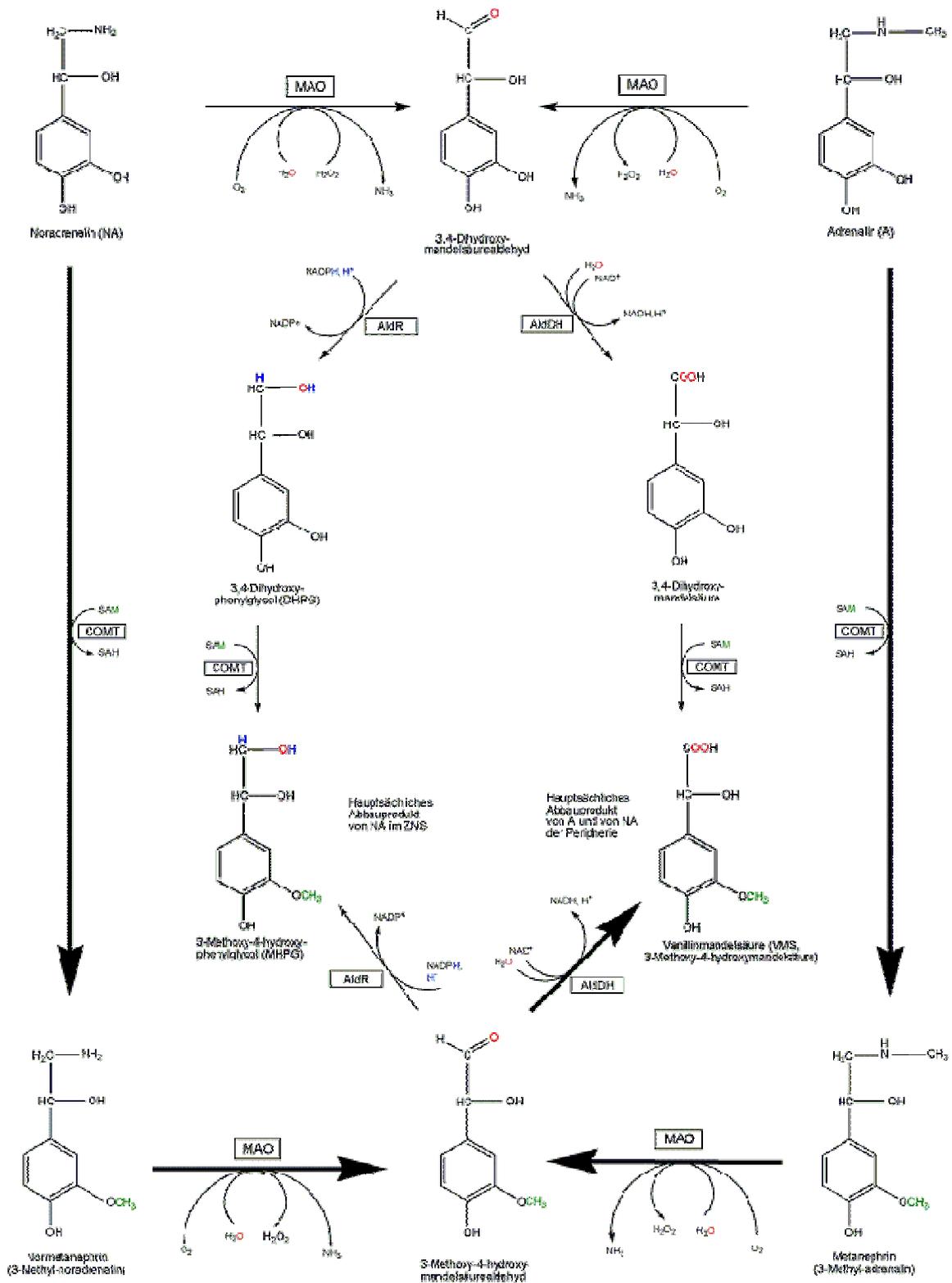


Abbildung 7: Abbau von Noradrenalin und Adrenalin

Das Hauptabbauprodukt des Noradrenalins und Adrenalins im efferenten sympathischen Nervensystem ist die Vanillinmandelsäure (VMA, 3-Methoxy-4-Hydroxymandelsäure). Dieser Metabolit entsteht durch die oxidative Desaminierung des Noradrenalins bzw. Adrenalins, der sich anschließenden Oxidation des gebildeten Mandelsäurealdehyds zur entsprechenden Säure und durch die abschließende O-Methylierung der meta-Hydroxylgruppen des Phenylrestes (Abbildung 7).

2.1.2 Diagnostische Relevanz

Die quantitative Bestimmung der Katecholamine ist diagnostisch relevant:

- für die Diagnose der sekundären Hypertonie
- für die Diagnostik und Verlaufsbeurteilung von Tumoren des sympatho-adrenalen Systems wie z. B. das Phäochromozytom oder das Neuroblastom.

Die Frage, ob die Katecholamine im Plasma oder im Urin bestimmt werden sollen, wird kontrovers diskutiert. Die überwiegende Mehrzahl der Untersucher bevorzugt aus methodischen wie auch pathophysiologischen Überlegungen die Bestimmung im Urin [4]. Die Konzentration der Katecholamine im Urin ist um drei Größenordnungen höher als die im Vergleich zu Plasma. Die Anforderungen an die Methodik bzw. Nachweisgrenze bei der Analyse sind daher deutlich geringer. Darüber hinaus erhält man bei der Bestimmung der Katecholamine in einem 24h-Urin eine Messgröße, die unabhängig von kurzfristigen Konzentrationsänderungen ist, wie sie im Plasma beobachtet werden. Im Gegensatz zu einer entsprechenden Blutabnahme ist die Gewinnung von Urin nicht invasiv und somit stressfrei für den Patienten.

Die Ruheausschüttung der Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin aus dem Nebennierenmark beträgt etwa 8 bis 10 ng pro Kilogramm Körpergewicht und Minute. Das im Blut zirkulierende Noradrenalin stammt zu über 70 % aus dem durch den Sympathikus noradrenerg innervierten Herzmuskel. Daher ist der

Noradrenalinspiegel im Blut durchschnittlich 2 bis 3-fach höher als der des nur im Nebennierenmark (NNM) synthetisierten Adrenalins.

Bei motorischen Aktivitäten steigt zunächst der Noradrenalinspiegel infolge der sympathisch gesteuerten Herzleistung an. Bei mittelschwerer und schwerer Arbeit (> 150 Watt) ist neben dem weiteren Konzentrationsanstieg des Noradrenalins auch ein Adrenalinanstieg im Blut zu beobachten.

Tabelle 3: Katecholaminspiegel im Blut

Bedingungen	Katecholaminkonzentration	
	Adrenalin [pmol/L]	Noradrenalin [pmol/L]
Ruhe	360	1100
Arbeit		
50 Watt	360	2200
100 Watt	520	2900
150 Watt	870	4850

Verändert nach [5]

Bei Stress steigen sowohl der Nordrenalin- als auch der Adrenalinspiegel im Blut stark an. Das Nebennierenmark schüttet die beiden Stresshormone verstärkt ins Blut aus. Gleichzeitig erfolgt eine zusätzliche Noradrenalinausschüttung aus den sympathischen postganglionären Neuronen.

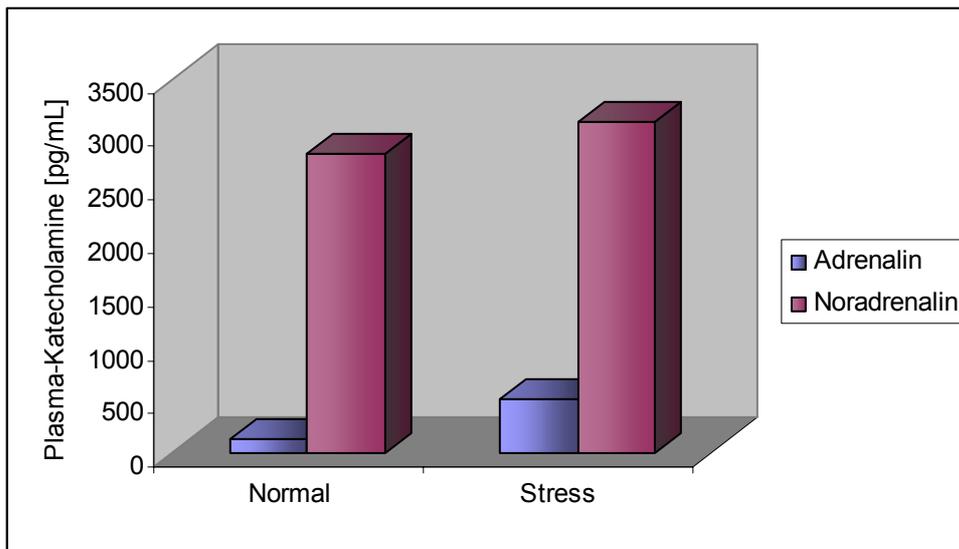


Abbildung 8: Stressbedingter Anstieg der Konzentrationen von Noradrenalin und Adrenalin im Blut (Ratte), Anstieg: Adrenalin 2000%, Noradrenalin 600% [5]

Vor diesem Hintergrund dient die quantitative Bestimmung der Katecholamine in Plasma und Urin in der Sportmedizin der Aufklärung adrenerger Stimulationen und Überlastungen [59, 60, 61, 99] und in der Arbeitsmedizin zur Stress- und arbeitsphysiologischen Grundlagenforschung.

Die quantitative Bestimmung der Katecholamine ermöglicht somit Rückschlüsse auf die Aktivität des sympatho-neuralen und sympatho-adrenalen Systems unter physischer und psychischer Belastung. Darüber hinaus finden sich charakteristische Veränderungen im Katecholamingehalt der Körperflüssigkeiten bei bestimmten Erkrankungen, bei denen diese beiden Systeme direkt oder indirekt involviert sind. Etwa bei hypotonen Kreislaufregulationsstörungen wie z.B. familiäre Dysautonomie [62, 63], bei Tumorerkrankungen des chromaffinen Gewebes wie Phäochromozytom [64, 65, 66], Neuroblastoma oder Ganglioneurom [67, 68, 3 und Übersichtsarbeit 69] und bei malignen Nierentumoren der Kindheit, dem Wilms-Tumor. Weitere Indikationen sind die Differentialdiagnose bei Hypertonie [70], die Parkinsonsche Krankheit [71, 72], affektive Störungen [73, 74], Herzleiden [75, 76, 77], Schilddrüsenüberfunktion oder Schilddrüsenunterfunktion [78] und chronische Niereninsuffizienz [79, 80].

Im folgendem wird näher auf das Phäochromozytom und das Neuroblastom eingegangen.

Das Phäochromozytom ist ein Tumor der chromaffinen Zellen, der in 90% der Fälle im Nebennierenmark lokalisiert ist und dort eine Hypersekretion von Adrenalin und Noradrenalin verursacht. Phäochromozytome treten vorwiegend bei Erwachsenen auf, mit einer maximalen Häufigkeit im 4. und 5. Lebensjahrzehnt. Während bei Kindern das männliche Geschlecht häufiger betroffen ist, bestehen bei Erwachsenen keine Geschlechtsunterschiede. Die Prävalenz des Phäochromozytoms in der Gesamtbevölkerung beträgt 0,005 % und bei Hypertonikern 0,5 %. Die Inzidenz wird mit 1 bis 2 Patienten pro 100.000 Einwohner und Jahr angegeben [3]. Die bösartige Form, das Phäochromoblastom, hat bei Erwachsenen eine etwa 10mal kleinere Inzidenz. Etwa 85 bis 90 % der Phäochromozytome gehen vom Nebennierenmark aus. Die rechte Nebenniere ist etwas häufiger betroffen als die linke.

Die frühe Diagnose eines Phäochromozytoms ist sehr wichtig, da lebensbedrohliche hypertensive Krisen damit verbunden sein können. Die chirurgische Sanierung führt fast immer zur völligen Heilung.

Neuroblastome sind ebenfalls Tumore des sympathico-adrenalen Systems. Sie gehen von Neuroblasten des Nebennierenmarks aus, können sich aber auch an anderen Stellen des sympathischen Nervensystems entwickeln. Neuroblastome sind nach Leukämien und Gliomen die häufigsten malignen Tumoren im Kindesalter. Sie treten zwischen der Geburt und dem 6. Lebensjahr auf. Ein Neuroblastom wird auf etwa 10.000 Geburten beobachtet bei Jungen etwas häufiger als bei Mädchen. Über 80 % der Neuroblastome betreffen Kinder in den ersten zweieinhalb Lebensjahren. Beim Neuroblastom ist die renale Ausscheidung von Homovanillinsäure, Vanillinmandelsäure und vor allem die des Dopamins erhöht [81].

2.1.2.1.1 Konjugierte Katecholamine

Untersuchungen von Buu [82, 83, 84], Nagel [85], Joyce [86], Westerink [87] und Weicker [88, 99] haben gezeigt, dass etwa 60 bis 90 % der Gesamtkatecholamine in Körperflüssigkeiten in konjugierter Form (Sulfo- und Glucuronsäure-Konjugate) vorliegen. Der hohe Konjugatanteil hat vermutlich eine bis heute noch wenig erforschte regulatorische Bedeutung [89].

Beim Menschen überwiegen die sulfokonjugierten Katecholamine mit 90 bis 95%, lediglich 5 bis 10 % liegen als β -Konjugate der Glucuronsäure vor.

Die Konjugation der Katecholamine mit dem Schwefelsäureanion kann sowohl in der 4-O- als auch in der 3-O-Position erfolgen. Die Esterbildung wird katalysiert durch die Phenolsulfotransferase (PST), die in zahlreichen Organen und Geweben wie Leber, Gehirn, Thrombozyten, Erythrozyten und Darmmucosa lokalisiert ist [90]. Als Sulfatgruppendonator fungiert das Phosphoadenosinphosphosulfat (PAPS).

Die Dekonjugation der 4-O-Sulfokonjugate wird von Sulfatasen katalysiert, die in der Leber, dem Gehirn, den Nieren und den Muskeln vorkommen. Auch die Dopamin- β -Hydroxylase kann aus 4-O-Dopaminsulfat Dopamin freisetzen.

Die im Nebennierenmark ausgeschütteten Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin werden jedoch nicht konjugiert, obwohl das Enzym Phenolsulfotransferase in diesem Gewebe vorkommt. Der Grund hierfür liegt darin, dass der Sulfatgruppendonator Phosphoadenosinphosphosulfat fehlt oder nur in Spuren vorhanden ist [91]. Die Differentialdiagnose des Phäochromozytoms basiert daher auf einem sehr kleinen Verhältnis von konjugierten zu freien Katecholaminen im Plasma.

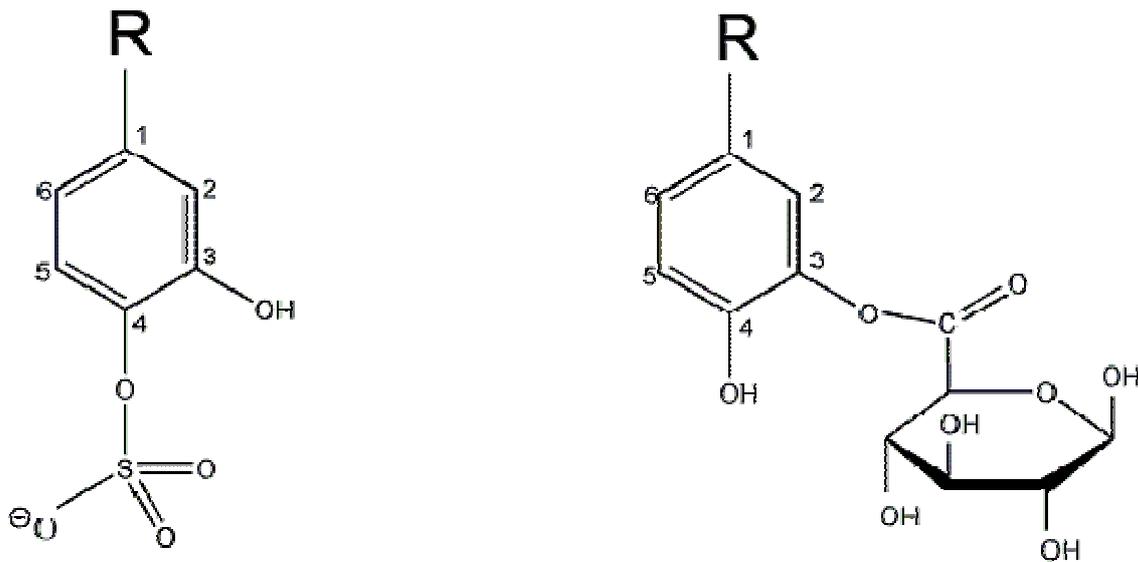


Abbildung 9: 4-O-Sulfo-konjugierte(a) und 3-O-Glucuronsäure-konjugierte (b) Katecholamine

Im Zentralnervensystem werden die Katecholamine nach der Ausschüttung aus den präsynaptischen Vesikeln in den synaptischen Spalt umgehend mit Sulfat konjugiert, da die Phenolsulfotransferase und das Phosphoadenosinphosphosulfat in hoher Konzentration vorliegen [92]. Aus den Konjugaten können die Katecholamine jedoch erneut freigesetzt werden (hohe Sulfataseaktivität im ZNS) und stehen für eine weitere Interaktion mit den Rezeptoren zur Verfügung, ohne dass eine präsynaptische Neurotransmitterfreisetzung stattgefunden haben muss. Die sulfatierten Katecholamine zeigen keine Affinität zu den Adrenorezeptoren.

2.1.2.1.2 Renales Katecholamin-Ausscheidungsmuster und Normalwerte der Katecholaminkonzentrationen in Körperflüssigkeiten

Das normale renale Ausscheidungsmuster des Katecholaminmetabolismus setzt sich zu 3 bis 7 % aus unveränderten Katecholaminen, zu 45 bis 60 % aus

Vanillinmandelsäure sowie zu 10 bis 20 % aus Normetanephrin und Metanephrin zusammen. Mit einem 24h-Sammelurin werden daher der gesamte periphere und zentrale Katecholaminstoffwechsel und dessen Metabolite erfasst.

Detaillierte Angaben zu den Normalbereichen der Katecholamine in Urin und Plasma sind in den folgenden Tabelle 4 und 5 zu finden.

Tabelle 4: Normalbereiche der freien Katecholamine im Urin

Katecholamine	Ausgeschiedene Menge pro 24h bzw. Konzentration	Methode
Noradrenalin	100-450 nmol/L	HPLC-FD [88]
Adrenalin	17-94 nmol/L	
Dopamin	420-3660 nmol/L	
Noradrenalin	94-490 nmol /24h	HPLC-FD [96]
Adrenalin	15-80 nmol/24h	
Dopamin	990-2431 nmol/24h	
Noradrenalin	bis 490 nmol/24h	HPLC-ECD [93]
Adrenalin	bis 131 nmol/24h	
Dopamin	bus 2550 nmol/24h	
Noradrenalin	bis 570 nmol/24h	HPLC-ECD [94]
Adrenalin	bis 150 nmol/24h	
Dopamin	bis 3240 nmol/24h	

Tabelle 5: Normalbereiche der Katecholamine im Plasma

Katecholamine	Konzentration [nmol/l]	Methode
Noradrenalin	0,71-2,36	Radioenzymatisch [97]
Adrenalin	0,11-0,66	
Dopamin	0,13-0,52	
Noradrenalin	0,33-5,98	HPLC-ECD [98]
Adrenalin	bis 4,77	
Dopamin	bis 0,80	
Nordrenalin	bis 2,49	HPLC-ECD [94]
Adrenalin	bis 0,46	
Dopamin	-	

2.1.3 Präanalytik

Die klinisch-chemische Bestimmung der Katecholamine erfolgt routinemäßig in einem entsprechenden 24h-Sammelurin. Die Patienten werden in der Regel darauf hingewiesen, dass 2 Tage vor und während der Sammlung der Genuss von Kaffee, Schwarztee, Alkohol, Cola-Getränken und Nikotin zu vermeiden ist. Diese Genussmittel sowie Stress und Medikamente wie Phenothiazine, Theophyllin, MAO-Hemmer können zu falsch erhöhten Werten führen. Falsch negative Werte können durch eine unvollständige Sammlung des 24h Urins oder des Sammelurins durch eine nicht ausreichende Stabilisierung erhalten werden. Über die Menge und die Art eines Stabilisierungsreagenzes finden sich in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben. Auch bezüglich der optimalen Einstellung des pH-Wertes eines 24h-Sammelurins gibt es Werte zwischen < 2 und 7 . Die

nachstehende Recherche von Literaturangaben verdeutlicht dies.

Die Arbeitsgruppe Präanalytik der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin empfiehlt beispielsweise die Einstellung des Urins auf einen pH kleiner 2 durch „Ansäuern“ [43], De Jong et al. [100] säuern den Urin auf pH 2 mit 85 %iger Phosphorsäure an. Talwar et al. [101] legen 10 mL einer 6 molaren Salzsäure in dem entsprechenden Sammelgefäß vor. Der resultierende pH-Wert der Urine lag zwischen pH 1 und pH 3. Wu et al. [102] verwenden sogar konzentrierte Salzsäure um pH-Werte von 2 bis 3 zu erreichen. Giles et al. [103] stabilisieren die Katecholamine in einem Urinpool mit 3 molarer Salzsäure und pH 3. Westerink et al. [104] legen 500 mg Natriummetabisulfit als Stabilisator im 24h-Urin-Sammelgefäß vor und stellen nach der Sammlung den Urin auf pH 3 bis 4 mit konzentrierter Ameisensäure ein. Kema et al. [26] wiederum empfehlen den 24h-Sammelurin in braunen, 2 L Gefäßen zu sammeln, legen jeweils ca. 250 mg Natriummetabisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) und Na_2EDTA vor, säuern die Proben mit Essigsäure auf pH 4 an und lagern diese bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Die Einstellung des pH-Wertes zwischen pH 3 und pH 5 empfiehlt der Leistungskatalog der MCL Medizinische Laboratorien [118]. In der Arbeitsanleitung der Fa. BIO-RAD [127] wird empfohlen den pH-Wert des gesammelten 24h-Sammelurins zu überprüfen und auf pH 5.0 bis 7.0 mit Natronlauge oder Essigsäure einzustellen und kühl zu lagern.

Die Gemeinschaftspraxis von Schiwara et al. [126] empfiehlt den 24h-Sammelurin über 5-10 mL Eisessig (96 %ige Essigsäure) zu sammeln, gibt aber ebenfalls keine Hinweise bezüglich des resultierenden pH-Wertes.

In der Literatur werden auch Alternativen zur am häufigsten verwendeten Salzsäure zur Stabilisierung der Katecholamine im 24h-Sammelurin vorgeschlagen wie z. B. der Zusatz von 0,75 molarem Ameisensäurepuffer [111] oder 0,2 g Borsäure pro Liter Urin [110]. Die potentielle Verätzungsgefahr, welche von der Mineralsäure ausgeht, soll durch diese Alternativen vermieden werden. Es gibt auch die Empfehlung eine bestimmte Menge konzentrierter Perchlorsäure dem 24h-Sammelurin zuzusetzen [119].

Moleman [105, 106] säuert den Urin nicht an, sondern setzt nur Antioxidantien zu. Pro Liter Urin werden je 250 mg Natriummetabisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) und Na_2EDTA

hinzugegeben. Die Sammlung des 24h-Urins erfolgt bei 4 °C und die Lagerung bei -20 °C.

In der Literatur finden sich auch kombinierte Zusätze wie bei Ito et al. [108]. Der 24h-Sammelurin wird hier in Gefäßen gesammelt, welche 50 mL Essigsäure und 1 g Natriummetabisulfit enthalten. Die Lagerung erfolgt bei -30 °C. Bei Panholzer et al. [109] wird der 24h-Urin gesammelt und abschließend angesäuert mit 10 mL pro Liter Urin einer Lösung bestehend aus 2,5 molarer Schwefelsäure, welche 100 g pro Liter Glycin enthält. Aliquots werden bei -20 °C gelagert.

Miki et al. [112] und Chan et al. [114] empfehlen den nativen 24h-Sammelurin so schnell wie möglich bei -80 °C tiefzufrieren. De Bellis et al. [113] kühlen den 24h-Sammelurin während der Sammelzeit bei 4 °C und lagern den Urin nach der Sammlung ohne Zusätze bei -80 °C. Giles et al. [103] empfehlen den 24h-Sammelurin ohne Zusätze, nur durch die Lagerung bei -30 °C, zu stabilisieren.

In der Praxis und in der Literatur findet am häufigsten die Salzsäure als Stabilisator des 24h-Sammelurins Verwendung. Die Salzsäure wird im 24h-Sammelgefäß vorgelegt. Ein Vergleich der Angaben über die Durchführung der Sammlung des 24h-Urins unter Zusatz von Salzsäure (Tabelle 6), zeigt, dass zum einen verdünnte Salzsäure (HCl) zum anderen sogar konzentrierte, d.h. rauchende HCl verwendet wird. Auch variiert die Stoffmenge der Salzsäure von 15 mmol bis 230 mmol. In den meisten Fällen werden keine Angaben gemacht, welchen pH-Wert der Urin nach der Sammlung aufweist und wie lange er bei Raumtemperatur gelagert werden kann.

Tabelle 6: Molmenge an vorgelegter Salzsäure bei der Gewinnung von 24h-Urin – Literaturauswahl geordnet nach aufsteigender Stoffmenge

vorgelegte Salzsäure	[mmol]	Literaturstelle	pH	Lagerung
5,2 mL 10 %ige	15	C. Bräutigam et al. [28]	k.A.	- 20 °C
10 mL 10 %ige	28	L. Thomas, Labor und Diagnose, 5. Auflage, 1998, Seite 1069 [3]	k.A.	- 25 °C (pH 2-3)

5 mL 25 %ige	38	E. Hollenbach et al. (1998), [116]	k.A.	-85 °C
30 mL 5 %ige	42	Medizinische Laboratoriums-Untersuchungen (Labor Dr. Gärtner Weingarten), 1991 [46]	k.A.	k.A.
5 mL 36 %ige	58	Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin, Mönchengladbach, 1995, [47]	k.A.	k.A.
10 mL 20 %ige	60	Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry (1996), [1]	k.A. Sammlung bei 4°C	k.A.
10 mL 25 %ige	77	Chromsystems, Arbeitsvorschrift für die HPLC-Analyse von Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin im Urin (2001) [128]	k.A.	2-8 °C; 5 Tage
15 mL 20 %ige	90	R. Enat et al. (1991), [117]	< 3,0	4 °C; 14 Tage
10 mL 32 %ige	100	ClinRep® Arbeitsanleitung für die Bestimmung der Katecholamine im Urin mittels HPLC (1998), [118]	k.A.	-20 °C (pH 2-3)
15 mL 25 %ige	115	Institut für Klinische Chemie, Kantonspital St. Gallen (2001), [119]	k.A.	k.A.
10 mL 36 %ige	116	A. Perme-Cibic et al. (1986), [120]	k.A.	4 °C, 14 Tage
20 mL 20 %ige	120	E. A. M. Gero et al. (1994), [121]	k.A.	4 °C
25 mL 20 %ige	150	A. Rivero-Marcotegui et al. (1995), [122]	k.A.	-20 °C
25 mL 20 %ige	150	Institut für Klinische Chemie,	k.A.	k.A.

Untersuchte Markermoleküle

		Klinikum rechts der Isar, TU München (2001), [57]		
20 mL 25 %ige	153	B. Wilmers et al. (1986), [177]	3-3,5	-20 °C
15 mL 36 %ige	174	G. P. Jackman (1981), [124]	k.A. Sammlung bei 4 °C	-20 °C
30 mL 20 %ige	180	Laboratory Corporation of America® Holdings (2001), [53]	1-3 Sammlung bei 4 °C	k.A.
30 mL 25 %ige	230	Laboratoriums - Untersuchungen im Institut für Klinische Chemie, Klinikum der Universität München, Großhadern, (1999), [45]	< 3,0	k.A.

k.A. ≙ keine Angaben

In der oft zitierten Publikation von Boomsma et al. [115] wird schließlich empfohlen, den Urin nicht anzusäuern da, die Katecholamine für 4 Tage bei Raumtemperatur stabil sind.

2.2 Metanephrin und Normetanephrin

2.2.1 Biochemie

2.2.1.1 Chemische Struktur

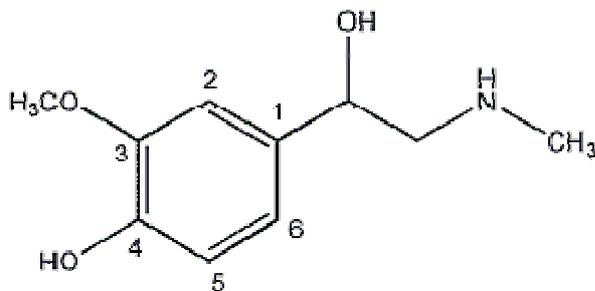


Abbildung 10: Metanephrin (ME), 3-Methyl-adrenalin, 4-Hydroxy-3-methoxy- α -(methylaminomethyl)benzenmethanol

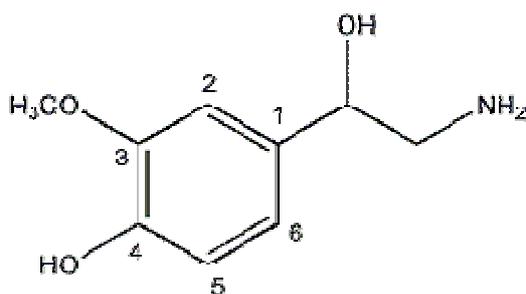


Abbildung 11: Normetanephrin (NME), 3-Methyl-noradrenalin, α -Aminomethyl)-4-hydroxy-3-methoxybenzenmethanol

2.2.1.1.1 Biosynthese

Das im Blut zirkulierende Noradrenalin aus noradrenergen Synapsen und aus dem Nebennierenmark wird zum größten Teil in der Leber zunächst über die Katechol-O-Methyltransferase (COMT) methyliert. Dies führt zur Bildung des Metaboliten Normetanephrin. Das im Blut zirkulierende Adrenalin aus dem Nebennierenmark wird über den gleichen Weg zu Metanephrin abgebaut (siehe Abbildung 7).

2.2.1.1.2 Abbau

Die Metanephrine werden im Urin in freier und konjugierter Form, sei es als Sulfat- oder Glucuronidkonjugat ausgeschieden. Die Ausscheidung der freien, unkonjugierten Gesamtmetanephrine im Urin beträgt dabei weniger als 3%. Zum größten Teil wird das gebildete Metanephrin und Normetanephrin aber über die Monoaminoxidase (MAO) abgebaut. Die oxidative Desaminierung führt zu 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäurealdehyd. Dieses gemeinsame Abbauprodukt wird über eine Aldehyddehydrogenase zu dem Hauptmetaboliten des Noradrenalins und Adrenalins nämlich Vanillinmandelsäure umgewandelt (siehe Abbildung 7).

2.2.2 Diagnostische Relevanz

Klinisch-chemische Laboruntersuchungen der Katecholamine und deren Metabolite finden vor allem für die Diagnose von Katecholaminsezernierenden, neurochromaffinen Tumoren wie Phäochromozytome, Paragangliome oder Neuroblastome statt.

Aufgrund zahlreicher Gründe ist die alleinige Bestimmung eines einzelnen

Katecholamins oder dessen Metaboliten nicht ausreichend für die Diagnose oder Bestätigung einer Tumors [129]. Zum Beispiel hat zirkulierendes Noradrenalin eine kurze Halbwertszeit und spiegelt nicht die Konzentration von Nordrenalin an den synaptischen Nervenendigungen wieder. Sport, Stress, Unterzucker, Wut, Angst, Kälte verursachen eine schnelle Erhöhung der zirkulierenden Katecholamine. Zusätzlich kommt hinzu, dass die Katecholaminausscheidung einem zirkadianen Tagesrhythmus folgt mit einer erhöhten Ausscheidung am Morgen und verringerten Ausscheidung in der Nacht. Die Medikation mit bestimmten Pharmaka kann auch einen Einfluss auf die Konzentration haben, z.B. Vasodilatoren erhöhen die Noradrenalin Werte, Phenothiazine erniedrigen sie. Pharmaka können auch die Bestimmungsmethode beeinflussen. Auch die Probengewinnung hat einen Einfluss auf bestimmte Werte. Bei Patienten mit einem Phäochromozytom kann die Freisetzung der Katecholamine intermittierend durch den Tumor erfolgen. Die Aufnahme und der Abbau der Katecholamine kann derart erhöht sein, dass nahezu normale Konzentrationen der Katecholamine im Urin und Plasma bestimmt werden, dagegen aber eine deutliche Erhöhung der Metabolite im Urin zu beobachten ist.

Die Messung der Metanephrine im 24h-Sammelurin wird als sensitivste Screening Methode für Phäochromozytome erachtet. Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass die Messung der Metanephrine nahezu zu keinen falsch-negativen Ergebnissen führt (~100 % klinische Sensitivität). Dennoch ist die Bestimmung der harngängigen Metanephrine nicht spezifisch für Phäochromozytome. Zu falsch-positiven Testergebnissen kommt es bei Patienten mit schweren Erkrankungen, welche zu erhöhtem Stress führen. Um die diagnostische Sensitivität und Spezifität zu maximieren werden gleichzeitig auch die freien Katecholamine und evtl. VMS und HVS bestimmt. Diese Markermoleküle sind etwas weniger sensitiv und führen zu mehr falsch-negativen Ergebnissen. Andererseits sind sie spezifischer und führen daher zu weniger falsch-positiven Ergebnissen.

Aussagen über eine wahrscheinliche Lokalisation des Phäochromozytoms sind möglich über die getrennte Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin, sowie von Metanephrin und Normetanephrin.

Sind die Noradrenalin- und Adrenalin- und/oder die Normetanephrin- sowie die und

Metanephrinausscheidung erhöht, so spricht dies für eine Lokalisation im Nebennierenmark.

Die alleinige Erhöhung der Noradrenalin- und/oder Normetanephrinausscheidung weist auf eine extraadrenale Lokalisation hin. Das kann aber auch der Fall sein bei großen Tumoren des Nebennierenmarks, bei denen der Tumor die Nebennierenrinde zerstört und dadurch die Induktion der Phenylethanolamin-N-Methyltransferase aufgehoben ist [3].

Tabelle 7: Referenzwerte der Metanephrine im Urin (Obere Entscheidungsgrenze) [130]

Urin	nmol/24h	µg/24h	Methode
Normetanephrin	bis 1950	bis 390	HPLC-ECD
Metanephrin	bis 1520	bis 320	RIA

Tabelle 8: Referenzwerte der Metanephrine im Plasma (Obere Entscheidungsgrenze) [150]

Plasma	nmol/L	µg/L	Methode
Normetanephrin	bis 0,61	bis 0,112	HPLC-ECD
Metanephrin	bis 0,31	bis 0,061	

2.2.3 Präanalytik

Da Normetanephrin und Metanephrin die Metaboliten von Adrenalin und Noradrenalin sind, gilt für deren Präanalytik zumeist dasselbe wie für die Katecholamine (siehe Kapitel 2.1.3). Generell sollten Medikamente, die die Katecholamine beeinflussen abgesetzt werden. Aus den gesammelten 24h-Urin werden die konjugierten und unkonjugierten Metanephrine nach saurer Hydrolyse bestimmt. Im Gegensatz zu den Katecholaminen wird die Ausscheidung der Metanephrine nicht so signifikant über die Nahrungsaufnahme beeinflusst [141]. Im Vergleich zu den Katecholaminen sind die Metanephrine im Urin in höherer Konzentration vorhanden und stabiler.

Für die quantitative Bestimmung der Metanephrine im 24h-Urin und der Probengewinnung werden wie bereits bei den Katecholaminen sehr unterschiedliche Angaben gemacht. Der im Folgenden aufgeführte Auszug aus der einschlägigen Literatur verdeutlicht dies.

Bei Kema et al. [138] erfolgt die 24h-Urinsammlung unter Vorlage von 250 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ und EDTA. Die Urine wurden mit Essigsäure auf pH 4 angesäuert und danach bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Die Proben wurden innerhalb eines Monats nach der Gewinnung analysiert.

Gamache et al. [139], Kairisto et al. [140] und Volin et al. [141] verwenden 24h-Sammelurinproben, denen von 10 mL einer 6 M HCl (60 mmol) vorgelegt wurden. Diese Proben wurden bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ eine Woche lang gelagert.

Bei Kaplan et al. [142] wird ein 24h-Sammelurin auf pH 1-2 angesäuert und bei $2\text{ }^\circ\text{C}$ für 10 Tage oder bei $-30\text{ }^\circ\text{C}$ für einen längeren Zeitraum gelagert.

Parker et al. [143] legen für die 24h-Urinsammlung 15 mL einer 6 M HCl (90mmol) vor.

Orsulak et al. [144] sammeln den Urin über 500 mg Natriummetabisulfit pro L Urin oder alternativ für die Bestimmung der Katecholamine und der Metabolite über 20 mL Essigsäure / Wasser (33/67 v/v). Nach der Sammlung wird der pH auf 4-4,5 mit

Essigsäure eingestellt. Die Proben können dann über mehrere Monate bei -20 °C gelagert werden.

Christenson et al. [145] empfehlen für eine 24h-Urinsammlung 10 mL konzentrierte HCl (36 %ig) vorzulegen und während und nach der Sammlung den Urin zu kühlen. Während der Sammlung und der Lagerung sollte der pH Wert aus Stabilitätsgründen unter 3 liegen.

Canfell et al. [146] legen für den 24h-Sammelurin 15 mL einer 5 molaren Schwefelsäure vor. Die Proben wurden 1 Woche bei 4 °C gelagert bzw. bei -20 °C falls die Lagerung diesen Zeitraum überschritt.

Kaplan et al. [4] beschreibt in seinem Lehrbuch, dass für die Bestimmung der Metanephrine im 24h-Sammelurin 25 mL an konzentrierter Salzsäure vorgelegt werden sollte. Die Verwendung von Borsäure wird nicht empfohlen. Die Probe sollte während der Sammlung gekühlt werden. Sachgerecht gesammelter Urin (pH < 3) kann für Wochen bei 4 °C bis 8 °C gelagert werden.

Die drei Reagenzien-Kit Hersteller Recipe [147], Chromsystems [148] und Bio-Rad [149] verwenden zwar in Ihren Arbeitsvorschriften für die HPLC-Analyse der Metanephrine im Urin alle Salzsäure, unterscheiden sich aber in der Stoffmengenkonzentration (10 mL 32 %ig, d.h. 100 mmol; 10 mL 25 %ig, d.h. 77 mmol und 10 mL 20 %ig d.h. 60 mmol). Die Firma Recipe gibt an, dass bei Kühlung die Proben mindestens 5 Tage haltbar sind. Sollen die Proben für länger gelagert werden, empfiehlt die Fa. Recipe einen pH-Wert von 1-2 einzustellen und bei -20 °C tiefzufrieren. Die Firma Bio-Rad empfiehlt gleich nach Sammlung einen pH-Wert von 1-3 einzustellen, um Bakterienwachstum zu verhindern. Die Firma Chromsystems gibt keinen pH-Wert an und empfiehlt die Proben bei -20 °C einzufrieren.

2.3 Vanillinmandelsäure und Homovanillinsäure

2.3.1 Biochemie

2.3.1.1 Chemische Struktur

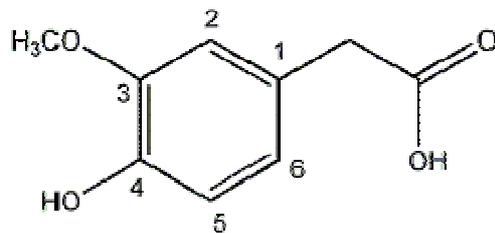


Abbildung 12: Homovanillinsäure (HVS), 4-Hydroxy-3-methoxyphenylacetat

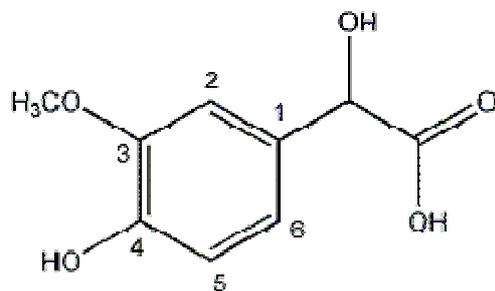


Abbildung 13: Vanillinmandelsäure (VMS), 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure

2.3.1.1.1 Biosynthese

Das Hauptabbauprodukt des Dopamins ist die Homovanillinsäure (siehe Abbildung 6).

Die Vanillinmandelsäure ist der vorwiegende Metabolit des Adrenalins und Noradrenalins in der Peripherie. Vanillinmandelsäure stellt 60 % der gesamten Abbauprodukte von Noradrenalin und Adrenalin dar (siehe Abbildung 7).

2.3.1.1.2 Abbau

Im Gegensatz zu den Metanephrinen wird die Vanillinmandelsäure nicht weiter abgebaut. Zum größten Teil wird sie in freier Form ausgeschieden und nicht als Konjugat.

2.3.2 Diagnostische Relevanz

Beim Neuroblastom, ein Tumor des sympatho-adrenalen Systems werden erhöhte Ausscheidungen vom Dopa, Dopamin, Homovanillinsäure, Vanillinmandelsäure, weniger häufig von Noradrenalin und Normetanephrin gemessen. Für die Diagnostik hat sich die gleichzeitige Bestimmung der Homovanillinsäure- und Vanillinmandelsäure-Ausscheidung im Urin, evtl. ergänzt durch Dopamin, durchgesetzt [133, 134]. Die Bestimmung dieser Verbindungen wird auch zur Therapiekontrolle eingesetzt.

Neuroblastome sind mit einem Anteil von 7-11 %, nach Leukämien und Gliomen, die dritthäufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Die Gesamtinzidenz in der Altersgruppe der unter 15-jährigen beträgt 0,9 pro 100.000, die altersspezifische

Inzidenz für die unter Einjährigen 5,4 und für das 1. bis 5. Lebensjahr 1,8 [135]. Über 80 % der Neuroblastome betreffen Kinder in den ersten zweieinhalb Lebensjahren. Das Neuroblastom bei Erwachsenen ist äußerst selten [136].

Für die Diagnostik des Neuroblastoms haben sich die Bestimmung der Urinausscheidung der VMS und HVS durchgesetzt. Die VMS ist ein sensitiver Marker im Frühstadium und die HVS bei klinisch erkannten Tumoren [137]. Ergänzt werden sollten beide Messgrößen durch die Bestimmung der Dopamin-ausscheidung. Diese ist ein guter Indikator einer persistierenden Erkrankung [134]. In Tabelle 9 und Tabelle 10 sind die Referenzwerte für Erwachsene und Kindern aufgeführt.

Tabelle 9: Referenzwerte der Vanillinmandelsäure (VMS) und der Homovanillinsäure (HVS) im 24h-Urin bei Erwachsenen

Urin	$\mu\text{mol}/24\text{h}$	$\mu\text{g}/24\text{h}$	Methode
VMS [130,131]	bis 33	bis 6600	HPLC-ECD
HVS [132]	bis 38	bis 6900	HPLC-ECD

Tabelle 10: Referenzwerte der Vanillinmandelsäure (VMS) und der Homovanillinsäure (HVS) im Urin bei Kindern [3]

Alter (Jahre)	VMS		HVS	
	mg/g Kreatinin	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin	mg/g Kreatinin	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin
0-1	18,8	11	32,6	20
2-4	11,0	6	22,0	14
5-9	8,3	5	15,1	9
10-19	8,3	5	12,8	8
>19	6,0	3	7,6	5

2.3.3 Präanalytik

Vanillinmandelsäure ist der Hauptmetabolit des Adrenalins und des Noradrenalins. Die Homovanillinsäure ist hingegen der Hauptmetabolit des Dopamins. Somit gilt für die Präanalytik dieser Markermoleküle zumeist dasselbe wie für die Katecholamine (siehe Kapitel 2.1.3). Generell sollten Medikamente, die die Katecholamine beeinflussen, abgesetzt werden. Vor allem auf die Einnahme von Bananen, Vanille, Walnüsse, Avocados, Schokolade, Tee und Kaffee sowie von Medikamenten die den Wirkstoff Paracetamol enthalten, sollte verzichtet werden. Im Gegensatz zu den Katecholaminen wird die Ausscheidung der VMS und HVS nicht so signifikant durch die Nahrungsaufnahme beeinflusst. VMS und HVS sind im Urin in höherer Konzentration vorhanden und stabiler als die Katecholamine.

Hinsichtlich der Gewinnung, Stabilisierung und Lagerung von VMS und HVS Urinproben wird im Folgenden ein Auszug aus Literaturangaben und Arbeitsvorschriften gegeben.

Die Arbeitsgruppe Präanalytik der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin gibt folgende Hinweise [43]. Vanillinmandelsäure (VMS) ist im Urin bei -20 °C über 1 Jahr stabil, bei 4-8 °C über 7 Tage stabil, wenn der pH-Wert kleiner 5 ist, und 7 Tage bei 20-25 °C bei einem pH-Wert von 3 bis 5. Die Art der Säure wird nicht angegeben.

Die Firma Bio-Rad [42] empfiehlt die Probe aus einem 24h-Sammelurin zu entnehmen, der über 10 mL 25 %iger Salzsäure (77 mmol) als Stabilisator gesammelt wurde. Bis zur Durchführung der Analyse müssen die Proben kühl (2-8 °C) aufbewahrt werden. Zur Vermeidung von Bakterienwachstum muss der pH-Wert der Urine unter 3,0 liegen.

Die Firma Recipe empfiehlt in Ihrer Arbeitsanleitung [36] den 24h-Urin in Gefäßen mit 10 mL konz. (32 %ige; 100 mmol) Salzsäure pro Liter Urin sammeln und bei 4°C aufzubewahren. Bei längerer Aufbewahrung nach dem Sammeln sollte der Urin auf pH 1-2 eingestellt und Aliquots bei -20 °C eingefroren werden.

Die Firma Chromsystems wiederum beschreibt in Ihrer Arbeitsvorschrift [39], dass

der 24-Stunden-Urin in einem geeigneten Gefäß über 10 mL 25 %iger Salzsäure (77 mmol) gesammelt werden sollte. Die auf diese Weise erhaltenen Sammelurine sollten einen pH-Wert unter 4,0 aufweisen und sind bei 2-8 °C zumindest 5 Tage haltbar. Bei längerer Aufbewahrung sollten Aliquote der Sammelurine bei -20 °C eingefroren werden.

Das Institut für Laboruntersuchungen „bioscientia“ [44] weist darauf hin, dass im Sammelgefäß des 24h-Urins keine Säure vorgelegt werden muss. Stattdessen sollen 0,5 mL 25 %ige Salzsäure im Urin-Versandröhrchen vorgelegt werden und keine Essigsäure oder Borsäure verwendet werden.

Das hiesige Institut für Klinische Chemie [45] lässt für die Bestimmung von VMS und HVS einen 24h-Urin in einem 2 L Sammelgefäß mit Zusatz von 30 mL 25 %iger (230 mmol) HCl sammeln.

Die Firma Ilamed AG [151] setzt für die Bestimmung der VMS im 24h-Urin Borsäure; als Konservierungsmittel zu.

Das Labor Dr. Gärtner Weingarten [152] legt im Sammelgefäß 30 mL 5 %iger HCl (42 mmol) vor.

Die Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin [47] legt 5-10 mL Eisessig für die Bestimmung von VMS in 24h-Urin vor und 5 mL konzentrierte Salzsäure (58 mmol) für die Bestimmung von HVS.

Das Institut für Klinische Chemie und Hämatologie des Kantonsspitals St. Gallen [119] fordert für die Bestimmung von VMS bzw. HVS 10 mL Urin aus 24h-Urinsammlung an. Angesäuert wird mit 1 mL konz. Perchlorsäure pro 100 mL Urin bzw. es werden 15 mL 25 %iger Salzsäure (115 mmol) für VMS und 25 mL 25 %iger HCl (191 mmol) für HVS für die gesamte Urinmenge vorgelegt. Der Urin ist im Dunkeln und bei 4 °C gekühlt zusammeln.

Die Gemeinschaftspraxis Laboratoriumsmedizin Dortmund Dr. Eberhard und Partner GbR [48] untersucht HVS und VMS aus einem Aliquot eines über 5 mL Eisessig gesammelten 24h-Urins.

Das Endokrinologikum [51] lässt für die Bestimmung der beiden Analyten den 24h-

Urin über 20 mL 10 %iger HCl (56 mmol) gekühlt sammeln.

Dr. Zoulek & Kollegen [52] empfehlen in dem 24h-Urin Sammelbehälter 20 mL 10 %iger (56 mmol) Salzsäure vorzulegen.

Die MEDLAB Analytik in Würzburg [153] empfiehlt den 24h-Urin über 10 mL 20 %iger (60 mmol) Salzsäure zusammeln.

Die Medizinische Laboratorien Düsseldorf [154] schreiben vor für die Bestimmung von VMS den 24h-Urin über 15 mL konz. Salzsäure (174 mmol) zusammeln. Für die Bestimmung von HVS soll 20 %ige Salzsäure vorgelegt werden. Welche Menge an Salzsäure vorgelegt werden soll, ist nicht vermerkt.

LabCorp [53] lässt 30 mL 6 molarer Salzsäure (180 mmol) bei der 24h-Urinsammlung zusetzen. Der pH-Wert des Urins sollte nach der Sammlung zwischen 1-3 liegen. Proben, welche Borsäure als Zusatz enthalten, werden nicht bestimmt.

Die Vorschrift des Labors Dr. Schottdorf [54] lässt für die Bestimmung von VMS und HVS 30 mL 6 N HCl (180 mmol) in das Sammelgefäß, bei Kindern die Hälfte, vorlegen. Der pH-Wert der Urinprobe sollte zwischen 2 und 5 liegen. Zur Lagerung werden keine Angaben gemacht.

Das Labor Arndt & Partner [155] lässt für die Analyse der Katecholamine und ihrer Metabolite den 24h-Urin über 5-10 mL 6 N Salzsäure (30-60 mmol) sammeln. Der Urin sollte auch während der Sammlung kühl gelagert werden, am Ende der Sammelperiode eingefroren oder so schnell wie möglich gekühlt ins Labor gebracht werden.

Synlab[®] der Verbund freier Laborärzte [55] legt für die VMS und HVS Bestimmung 10 mL 25 %ige HCl (77 mmol), in das 24h-Sammelgefäß vor.

Das Labor Enders [56] schreibt vor den 24h-Urin über 10 mL 96 %iger Essigsäure zusammeln. Weiterhin ist der Hinweis vorhanden, dass die Säure direkt nach der ersten Miktion zugegeben werden soll und keine Salzsäure verwendet werden darf.

Das Labor von Becker, Olgemöller & Partner [50] lässt den 24h-Urin über 10 mL 25 %iger Salzsäure (77 mmol) sammeln.

Nach der Vorschrift des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum rechts der Isar der TU München [57] erfolgt die Sammlung des 24h-Urins unter Zusatz von 25 mL 6 N HCl (150 mmol).

Die MCL Medizinische Laboratorien [118] empfehlen den 24h-Sammelurin auf pH 3-5 einzustellen und bereits während der Sammlung kühl zu lagern.

2.4 Serotonin und 5-Hydroxyindolessigsäure

2.4.1 Biochemie

2.4.1.1 Funktion und chemische Struktur

Serotonin (5-Hydroxytryptamin) ist das hydroxylierte biogene Amin der Aminosäure Tryptophan. Es ist beteiligt an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen, welche die Kontraktion der glatten Muskulatur, die Blutdruck-Regulation und die Neurotransmission im peripheren und zentralen Nervensystem einschließen. Serotonin ist in den Thrombozyten enthalten, aus denen es bei deren Adhäsion und Aggregation freigesetzt wird. Dies geschieht beispielsweise bei Gefäßverletzungen und bei Entzündungsreaktionen. Der Hauptanteil (ca. 80 %) des im Körper befindlichen Serotonins ist in den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes lokalisiert. Serotonin stimuliert die glatte Muskulatur des Darmes und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Darmaktivität. In der Peripherie wirkt Serotonin als Vasokonstriktor und stimuliert seine Freisetzung aus aggregierenden Thrombozyten. Es agiert als Neurotransmitter im Nervensystem des Darmes und als autokrines Hormon bei seiner Freisetzung aus den enterochromaffinen Zellen des Darmes und des Pankreas. Die genaue Funktion des Serotonins im Gastrointestinaltraktes ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

Nur 1-2 % des Serotonins findet sich im Gehirn. Ein Großteil der Zellkörper der serotoninergeren Neuronen sind im Mittelhirn (Raphe Kerne) lokalisiert, von wo aus verschiedenste Gehirnregionen innerviert sind. Einige Serotonin-Neuronen sind an der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus beteiligt. Werden die Serotonin-Neuronen in den Raphe Kernen bei Tieren selektiv zerstört oder die Serotoninsynthese gehemmt, tritt Schlaflosigkeit ein. Wird Tryptophan, ein Vorläufer von

Serotonin injiziert, schlafen die Tiere ein [5]. Serotonin spielt auch eine wichtige Funktion bei der sexuellen Aktivität, bei der Appetitkontrolle, der Aggressivität und des Antriebs/motorischen Aktivität vor allem sexuellen und aggressiven Ursprungs [7].

In Abbildung 14 ist die chemische Struktur von Serotonin (Sero) auch 5-Hydroxytryptamin (5-HT) genannt wiedergegeben. Es ist ein heterozyklisches Amin bzw. Indolderivat, welches im Jahre 1937 zum ersten Mal von Ersparmer und Vialli isoliert wurde. In Abbildung 14 ist die Struktur seines Hauptabbauproduktes 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIES) dargestellt.

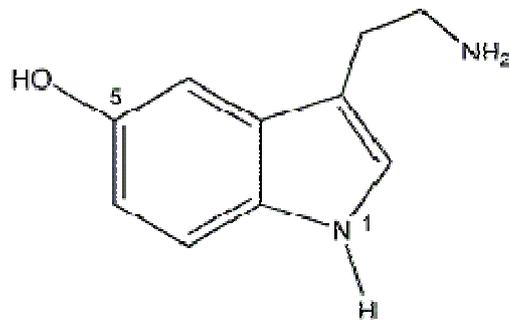


Abbildung 14: Serotonin (Sero), 5-Hydroxytryptamin (5-HT)

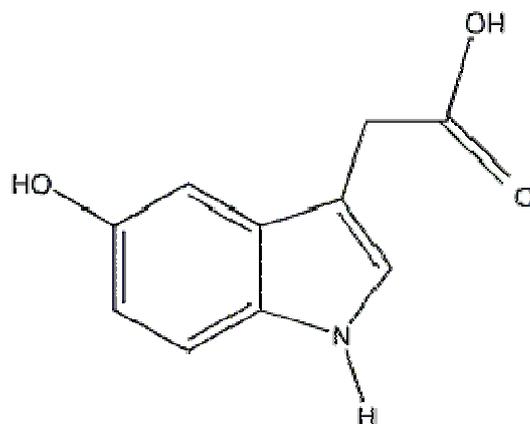


Abbildung 15: 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIES)

2.4.1.1.1 Biosynthese

Die Biosynthese des Serotonins findet im Gehirn, im Rückenmark, in den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes, im Pankreas, im Thymus, in den Bronchien und in der Schilddrüse statt. Zirkulierendes Serotonin kann nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Ausgangspunkt der Biosynthese ist die für den Menschen essentielle Aminosäure L-Tryptophan, die von den Serotoninproduzierenden Zellen aus dem Blut aufgenommen wird. Die Biosynthese von Serotonin (5-Hydroxytryptamin) aus Tryptophan entspricht der des Dopamins aus Tyrosin. Zuerst erfolgt durch eine mischfunktionelle Oxygenase (Tryptophanhydroxylase) eine Hydroxylierung am Indolring unter Bildung von 5-Hydroxytryptophan. Ungefähr 1 % bis 3 % des über die Nahrung aufgenommenen Tryptophans wird normalerweise über diesen Weg metabolisiert. In einer zweiten Reaktion wird 5-Hydroxytryptophan in einer Pyridoxalphosphat-abhängigen Reaktion zu 5-Hydroxytryptamin (5-HT) decarboxyliert (5-Hydroxytryptamin-decarboxylase). Die Geschwindigkeit der Serotoninbiosynthese wird durch die Konzentration an verfügbarem Tryptophan im Gehirn bzw. Blut bestimmt, wobei die Tryptophanhydroxylase im Gehirn eine ungewöhnlich hohe Michaelis-Konstante besitzt. Im Gehirn wird 5-Hydroxytryptamin (5-HT) im Perikaryon der Nervenzelle synthetisiert und dann über das Axoplasma den Nervenendigungen zugeführt. Eine Speicherung erfolgt in Vesikeln, aus denen das biogene Amin bei Stimulierung in den synaptischen Spalt freigesetzt wird.

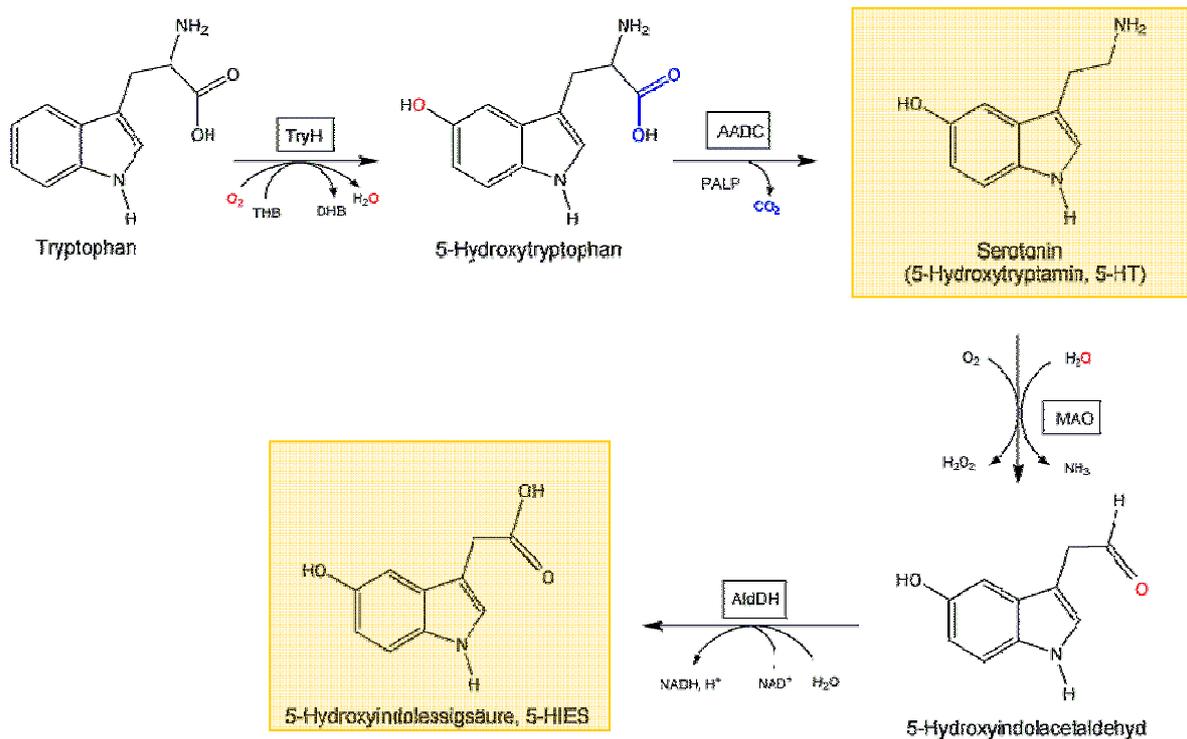


Abbildung 16: Biosynthese und Abbau von Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT)

2.4.1.1.2 Abbau

Der Abbau von 5-Hydroxytryptamin (5-HT) erfolgt durch die mitochondriale Monoaminoxidase. Dabei entsteht 5-Hydroxyindolacetaldehyd, dessen Dehydrierung durch die Aldehyddehydrogenase zur Bildung von 5-Hydroxy-indolacetat führt. Das Abbauprodukt 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIES) gelangt über den Liquor ins Blut und wird in der Leber nur zu einem äußerst geringen Teil konjugiert. Die Konjugation mit Sulfonsäure findet zum anderen auch im Gehirn statt. Es entsteht 5-Hydroxyindolessigsäure-Glucuronid und 5-Hydroxyindolessigsäure-Sulfat. Diese Abbauprodukte werden renal über den Urin ausgeschieden. Somit werden Serotonin und 5-Hydroxyindolessigsäure hauptsächlich in ihrer freien Form ausgeschieden.

2.4.2 Diagnostische Relevanz

Serotonin ist im Gehirn der Transmitter der serotoninergen Neurone. Anomalien in deren Funktion gehen einher mit Anorexie, Angst, Depression, Manie und Schizophrenie. Die Degeneration serotoninergener Neurone findet sich bei Morbus Alzheimer und Parkinson.

Klinisch spielt Serotonin eine Rolle bei der Depression. Viele Studien haben gezeigt, dass Veränderungen in der serotoninergen neuronalen Funktion des zentralen Nervensystems bei Patienten einhergehen, die vorwiegend an Depressionen leiden. Bekräftigt wird dieser Zusammenhang durch:

1. eine Vielzahl von Befunden, welche bei depressiven Patienten niedrige Werte an 5-Hydroxyindolessigsäure im Liquor aufweisen;
2. verringerte Serotonin und 5-Hydroxyindolessigsäure Werte in postmortalem Gehirngewebe von Depressiven und
3. die Beobachtung, dass 5-Hydroxytryptophan, der Vorläufer von Serotonin, ein effektives Antidepressivum nur bei Patienten ist, welche erhöhte 5-Hydroxyindolessigsäure Werte im Liquor aufweisen.

Des Weiteren führt eine Behandlung mit Antidepressiva, welche die Wiederaufnahme von Serotonin durch die präsynaptischen Neuronen hemmen und dadurch die Konzentration von Serotonin an der serotoninergen Synapse erhöhen, zu einem positiven klinischen Ansprechen bzw. Bild [1].

Periphere Anomalien in serotoninabhängigen Prozessen werden mit Pharmakaverursachten Erbrechen im Zusammenhang gebracht sowie mit Hypertension, Migräne, Herzarrhythmien, Raynaud Krankheit, Fibrotisches Syndrom und Symptome des Karzinoid Syndroms. Die quantitativ ausgeprägteste Abweichung in der Serotonin Produktion und des Metabolismus ist bei Karzinoid-Tumor Patienten vorhanden.

Karzinoide sind neuroendokrine Tumore, die von enterochromaffinen Zellen abstammen. Bei verstärkter Bildung von Serotonin in einem Karzinoid-Tumor wird

dies entweder schon im Tumor oder im Blut zu 5-Hydroxyindolessigsäure oxidativ desaminiert oder die Thrombozyten nehmen verstärkt Serotonin auf. Die Inzidenz der Karzinoid-Tumore beträgt etwa 1,2 bis 2,2 auf 100.000 Personen und Jahr [8]. Karzinoid-Tumore sind in nahezu allen Organen beschrieben. Die meisten Karzinoide treten im Blinddarm, Dünndarm oder Rektum auf. 45 % der Patienten haben nachweislich Metastasen. Für alle Karzinoide unabhängig ihrer primären Lokalisation ist die 5 Jahres Überlebensrate ungefähr 50 % [8]. Zur Diagnostik von Karzinoid-Tumoren wird primär die Ausscheidung von 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIES) im Urin gemessen. Die Diagnostik wird verbessert durch die zusätzliche Bestimmung von Serotonin in den Thrombozyten und im Urin [186].

Tabelle 11 gibt die Referenzbereiche für Serotonin in verschiedenen Matrices wieder.

Tabelle 11: Referenzbereich Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT)

Serotonin (5-HT)		
Urin [12]	0,05-0,25 mg/24h	0,3-1,3 µmol/24h
[9]		0,34-0,95µmol/24h
Thrombozyten [1,10]	125-500 ng/10 ⁹ Thrombozyten	0,7-2,8 nmol/Thrombozyt
Liquor [13]		5,7-12,0 nmol/l

Wie oben erwähnt ist die 5-HIES-Bestimmung die Basisuntersuchung für ein Karzinoid. In Tabelle 12 sind die Referenzbereiche von 5-Hydroxyindolessigsäure aus unterschiedlichen Matrices wiedergegeben.

Eine Ausscheidung von 5-HIES im Urin in einer Menge größer 15 mg (78 µmol)/24h schließt Einflussgrößen und Störfaktoren weitgehend aus und spricht mit hoher Wahrscheinlichkeit für ein Karzinoid. Die Bestimmung von 5-HIES im Urin ist ein guter diagnostischer Marker, vor allem für Mitteldarm-Karzinoide.

Tabelle 12: Referenzbereich 5-HIES

5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIES)		
Urin [1; 11; 14; 15]	2-9 mg/24h	2-50 µmol/24h
Liquor [13]		80,8-143,2 nmol/l

2.4.3 Präanalytik

5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIES) und falls erforderlich auch Serotonin (5-HT) werden aus einem 24h-Sammelurin quantifiziert. Bei der Sicherung der Diagnose ist darauf zu achten, dass Serotonin-haltige Nahrungsmittel und bestimmte Medikamente mindestens 2 Tage vor und während der Urinsammlung nicht eingenommen werden.

Folgende Medikamente verursachen falsch-negative Ergebnisse:

p-Chlorophenylalanin, Acetylsalicylsäure, Corticotropin, Chlorpromazin, Streptozocin, Promethazin, Ethanol, Imipramin, Isoniazid, Monoaminoxidase Inhibitoren, Methenamin, Methyldopa, Phenothiazine

Falsch-positive Werte sind bei folgenden Medikamenten bekannt:

Azetanilid, Koffein (Kaffee, schwarzer Tee), Cumarine, Methocarbamol, Mephenesin, Guaifenesin, Ephedrin-HCl, Nikotin, Phenobarbital, Phenazetin, Rauwolfia, Reserpin, Paracetamol

Hinsichtlich der Nahrung werden falsch-positiv erhöhte Werte erhalten bei Aufnahme folgender Serotonin-haltiger Nahrungsmittel: Ananas, Auberginen, Avocados, Johannisbeeren, Kiwis, Melonen, Mirabellen, Pflaumen, Stachelbeeren, Tomaten und vor allen durch den Verzehr von Walnüssen und Bananen innerhalb

von 12 Stunden vor Beginn der Urinsammlung [25]. Das gastrointestinal absorbierte Serotonin wird größtenteils zu 5-HIES metabolisiert und anschließend im Urin ausgeschieden.

In der Literatur und Vorschriften sind unterschiedliche Empfehlungen und Vorgehensweisen beschrieben, welche die Uringewinnung und Lagerung für die Bestimmung von 5-HT und 5-HIES betreffen.

Thomas et al. [3] beschreiben, dass bei Kühlung während der Sammlung eine Ansäuerung des Urins nicht erforderlich ist. Für den Postversand oder die Sammlung bei Raumtemperatur werden 20 mL Eisessig vorgelegt. 5-HIES ist in auf pH 2-3 angesäuerten Urin bei 4 °C bis zu 2 Wochen stabil.

Bei Goldenberg [16] wird der 24h-Urin über Borsäure als Stabilisator gesammelt. Unter diesen Bedingungen ist 5-HIES eine Woche bei Raumtemperatur und einen Monat bei -20 °C stabil.

Koch et al. [17] säuern den Sammelurin mit 6 molarer Salzsäure auf pH 2 an und lagern die Proben bei -35 °C.

Bei Shibata et al. [18] erfolgt die Sammlung bei 4 °C und im Dunkeln. 50 mL Urin werden mit 0,95 mL kalter Perchlorsäure, welche 0,1 % Cystein enthält, versetzt.

Nach Tsuchiya et al. [23] erfolgt keine Zugabe von Ascorbinsäure, Na₂EDTA oder anderen Stabilisatoren, da bei Tiefkühlagerung und physiologischem pH-Wert die Analyten stabil sind.

Feldman [12] sammelt den 24h-Urin bei 1°C stellt sofort nach der Sammlung den pH-Wert auf 3 ein. Die Lagerung erfolgt bei -60 °C.

Muskiet et al. [20] säuern die Urinproben mit Salzsäure auf pH 1,0 an und lagern diese bis zur Analyse bei -20 °C.

Nach Vorgabe von Pussard et al. [27] wird der 24h-Urin auf pH 4 mit Essigsäure angesäuert und eingefroren.

Yamaguchi et al. [30], Parker et al. [31] und Gironi et al. [15] legen für die 24h-Urin Sammlung 10 mL bzw. 15 mL 6 molare Salzsäure (90 mmol) im Sammelgefäß vor.

Rosano et al. [19] hingegen legen 12 mL 6 M Salzsäure (72 mmol) im Sammelgefäß vor.

Bräutigam et al. [28] legen 5 mL 3 M Salzsäure (15 mmol) für die 24h-Urinsammlung vor und lagern die Proben bei -20 °C.

Davis et al. [21] sammeln den Urin in Gegenwart von Natriummetabisulfit (0,5 mg/mL Urin) und lagern diesen bei -70°C. Vor der Analyse wird die Urinprobe mit Perchlorsäure auf eine Endkonzentration von 0,4 mol pro Liter versetzt.

Jouve et al. [22] versetzten einen über Nacht gesammelten Urin (12h) mit Natriummetabisulfit, Na₂S₂O₅ (1g/L) und bewahrten die Proben bei -60 °C auf. Nach dem Auftauen und Zentrifugieren wird die Urinprobe auf pH 5 mit 0,1 M Essigsäure eingestellt.

Bei Meijer et al. [8, 32] und Kema et al. [24, 26, 29] erfolge die 24h-Urinsammlung unter Vorlage von 250 mg Na₂S₂O₅ und EDTA. Die Proben werden mit Essigsäure auf pH 4 angesäuert und danach eingefroren. Die Proben werden innerhalb einer Woche nach Sammlung analysiert.

Zuetenhorst et al. [33] sammeln 4h- bzw. 8h-Urinproben und legen Essigsäure vor.

Thorre et al. [34] und Kema et al. [9] beschreiben, dass eine optimale Stabilisierung von 5-HIES und 5-HT bei einem pH-Wert von 3,2 und einer Zugabe von Antioxidantien wie z.B. Natriummetabisulfit, Ascorbinsäure, Na-EDTA oder L-Cystein erreicht wird.

Panholzer et al. [35] empfehlen den 24h-Urin mit 2,5 molarer Schwefelsäure, welche 10 g/L Glycine enthält, anzusäuern (10 mL/L Urin).

Die Firma Recipe empfiehlt in Ihren Arbeitsanleitungen [36,37] den 24h-Urin in Gefäßen mit 10 mL konz. (32 %ige) Salzsäure pro Liter Urin zusammeln und bei 4 °C aufzubewahren.

Die Firma BIO-RAD hingegen empfiehlt für die Bestimmung von 5-HT [41] und 5-HIES [42] den 24h-Urin über 10 mL 25 %iger Salzsäure zu sammeln und den Urin bis zur Analyse bei 2-8 °C zulagern. Zur Vermeidung von Bakterienwachstum soll der pH-Wert des Urins unter 3,0 liegen.

Die Firma Chromsystems wiederum erwähnt in Ihren Arbeitsvorschriften [38, 39], dass 5-HIES im saurem Milieu ($\text{pH} < 3,0$) instabil ist. Der 24h-Urin sollte in einem geeigneten Gefäß über 10 mL Eisessig gesammelt werden. Der Sammelurin sollte einen pH-Wert von 4,0 bis 6,0 aufweisen und bei 2-8 °C im Dunkeln aufbewahrt werden, um lichtinduzierte Zersetzungseffekte zu vermeiden. Der optimale pH des Sammelurins liegt bei einem Wert von 4,0. Eine Lagerung von mehr als 3 Tagen soll bei -20 °C erfolgen. Salzsaurer Sammelurin sollen mit Natronlauge auf pH 4,0 bis 6,0 eingestellt und möglichst schnell analysiert werden.

Die Arbeitsgruppe Präanalytik der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin gibt folgende Hinweise [43]. 5-HIES ist im Urin bei -20 °C und 4-8 °C für 2 Tage stabil sowie für 2 Stunden bei 20-25 °C. Als Stabilisierung ist nur Ansäuern vermerkt ohne weitere Angaben.

Das Institut für Laboruntersuchungen „bioscientia“ [44] weist darauf hin, dass im Sammelgefäß des 24h-Urins keine Säure vorgelegt werden muss. Stattdessen sollen 0,5 mL 25 %ige Salzsäure im Urin-Versandrohrchen vorgelegt werden und keine Essigsäure oder Borsäure verwendet werden.

Das hiesige Institut für Klinische Chemie [45] lässt für die Bestimmung von 5-HIES einen 24h-Urin mit Zusatz von 30 mL 25 %iger HCl (230 mmol) sammeln. Für die Bestimmung von 5-HT werden die vorgenannten Hinweise ergänzt durch das Sammeln und Transportieren unter zusätzlicher Kühlung (4°C).

Das Labor Dr. Gärtner Weingarten [46] schreibt für die Bestimmung von 5-HT bzw. 5-HIES vor, in das Sammelgefäß 20 mL bzw. 30 mL 5 %iger HCl (28 bzw. 42 mmol) vorzulegen.

Die Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin [47] legt in den 24h-Urin 5-10 mL Eisessig für die Bestimmung von 5-HIES vor.

Die Gemeinschaftspraxis Laboratoriumsmedizin Dortmund Dr. Eberhard und Partner GbR [48] untersucht 5-HIES aus einem Aliquot eines über 5 mL Eisessig gesammelten 24h-Urins. Die Serotoninbestimmung erfolgt in einem im eingefrorenen Zustand versandten Aliquot, eines nicht angesäuerten 24h-Urins.

Der Klinikleitfaden Labordiagnostik [49] lässt für die Bestimmung von 5-HIES und

5-HT in den 24h-Urin 10 mL 25 %ige Salzsäure (77 mmol) vorlegen. Für die Sammlung von 5-HIES ist der Vermerk Lichtgeschützt aufgeführt.

Das Labor Becker, Olgemöller & Partner [50] schreibt für die 5-HIES-Bestimmung in den 24h-Urin die Sammlung über 10 mL Eisessig vor.

Das Endokrinologikum [51] lässt den 24h-Urin für die Bestimmung von 5-HIES über 20 mL 10% iger HCl (56 mmol) lichtgeschützt sammeln.

Für die Bestimmung von 5-HIES empfehlen Zoulek & Kollegen [52] einem 5 mL Aliquot eines 24h-Urins 0,5 mL 25 %iger HCl zuzusetzen. Für die Bestimmung von Serotonin erfolgt die 24h-Urinsammlung über 5-10 mL Eisessig.

LabCorp [53] erwähnt, dass für die 24h-Urinsammlung zur Bestimmung von 5-HIES ein Stabilisator Zusatz nicht nötig ist. Der Zusatz von 30 mL 6 N HCl oder 1g Borsäure pro Liter Urin haben keinen Einfluss auf die Bestimmung von 5-HIES. Die Urinrobe sollte bei 2-8 °C aufbewahrt werden.

Die Arbeitsvorschrift des Labors Schottdorf [54] lässt für die Bestimmung von 5-HIES 30 mL 6 N HCl (180 mmol) in das Sammelgefäß, bei Kindern die Hälfte, vorlegen. Der pH-Wert der Urinprobe sollte zwischen 2 und 5 liegen. Zur Lagerung werden keine Angaben gemacht.

Synlab® der Verbund freier Laborärzte [55] legt für die 5-HIES-Bestimmung 10 mL 25 % HCl (77 mmol) in das 24h-Sammelgefäß vor.

Das Labor Enders [56] lässt für die Bestimmung von 5-HIES den 24h-Urin über 10 mL 96 %iger Essigsäure sammeln. In der Vorschrift ist der Hinweis enthalten, dass die Säure direkt nach der ersten Miktion zugegeben werden soll.

In der Anleitung des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum rechts der Isar der TU München [57] erfolgt die Sammlung des 24h-Urins unter Zusatz von 25 mL 6 N HCl (150 mmol) für die Bestimmung von 5-HIES und 5-HT. Für die Bestimmung von 5-HT soll der 24h-Urin unter Kühlung (4 °C) gesammelt werden.

3 SAMMLUNG VON 24H-URIN : LITERATURRECHERCHE

Wie aus der Literaturübersicht (Kapitel 2) bezüglich der Präanalytik der untersuchten Analyten zu entnehmen ist, werden sehr wenige Aussagen zum Ablauf einer 24h-Urinsammlung beziehungsweise zum Sammelgefäß gemacht. Eine Standardisierung ist notwendig, um einheitliche Referenzintervalle und Entscheidungsgrenzen zu erhalten. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass selbst die „European Urinalysis Guidelines“ [156], herausgegeben von der European Confederation of Laboratory Medicine (ECLM), nur sehr kurz auf die Sammlung und Stabilisierung eines 24h-Urins eingehen. Neben einer adäquaten chemischen Stabilisierung der harngängigen Marker-moleküle sollten auch bestimmte Eigenschaften des Sammelgefäßes gewährleistet sein.

3.1 Vorgehensweise

Ein 24h-Sammelurin beinhaltet alle entleerten Urinportionen über einen Zeitraum von 24 Stunden. Eine Sammlung des 24h-Urins kann zu jeder Tageszeit begonnen werden durch Entleerung der Blase und Notierung der Uhrzeit. Der gesamte Urin der folgenden 24 Stunden wird daraufhin gesammelt.

Normalerweise weist das Fachpersonal die Patienten ein, wie eine adäquate

Urinsammlung zu erfolgen hat. Da jedoch die Urinsammlung vorwiegend zu Hause oder am Arbeitsplatz erfolgt, ist es notwendig, eine schriftliche Sammelanleitung, die gegebenenfalls illustriert ist, dem Patienten auszuhändigen. Diese Vorgehensweise erhöht die Compliance des Patienten, d.h. die gewissenhafte und vollständige Sammlung des Urins über 24 Stunden.

3.2 Sammelgefäß

3.2.1 Volumen

Das Sammelgefäß für eine 24h-Urinsammlung sollte so konzipiert sein, dass es ein Volumen von 2 bis 3 Litern umfasst.

3.2.2 Material

Das Sammelgefäß sollte aus Materialien bestehen, welche

1. die diagnostischen Markermoleküle nicht unspezifisch adsorbieren,
2. einen ausreichenden Lichtschutz gewähren,
3. einen geruchsdichten Verschluss ermöglichen,
4. säurefest sind und somit eine Stabilisierung der Markermoleküle erlauben.

Sekundärgefäße, zumeist Gefäße welche ein Aliquot der Gesamtprobe enthalten, sollten einfach d.h. ohne Verschüttungsrisiko aus dem Primärgefäß befüllbar sein.

3.2.3 Stabilisierungsreagenz

Die in dieser Arbeit untersuchten harngängigen Markermoleküle sind in der Urinmatrix bei Raumtemperatur alle mehr oder weniger instabil. Oxidative und lichtinduzierte Prozesse führen zur Veränderung der chemischen Struktur der Analyte. Dem Urin muss folglich ein Stabilisierungsreagenz bzw. Antioxidans zugesetzt oder vorgelegt werden. Wie im Kapitel 2 bereits aufgezeigt werden zur Stabilisierung der untersuchten Markermoleküle vorwiegend Säuren eingesetzt. Bei der Verwendung von Säuren ist darauf zu achten, dass die Säure nicht zu hoch konzentriert ist und daher zu Verätzungen führen kann. Ideal wäre daher ein Stabilisierungsreagenz in nicht-flüssiger Form.

3.2.4 Beschriftung

Alle Probengefäße müssen mit einem Aufkleber etikettiert sein. Die Beschriftung sollte auch bei Tiefkühlung erhalten bleiben. Die Beschriftung sollte auf dem Gefäß positioniert sein und nicht auf dem Deckel. Auf dem Etikett sollten sich folgende Informationen befinden:

- Patienten Identifikation
- Sammeldatum
- Sammelzeit
- Sammelvolumen

Die Markierungen zum Ablesen des Gesamtvolumens des 24h-Urins soll gut sichtbar sein. Falls der Urin zu einem Labor verschickt wird müssen zusätzliche

Kennzeichnungen des Biologischen Materials angebracht werden und die Verpackung muss dem europäischen Standard EN 829 [158] entsprechen.

3.2.5 Transport, Lagerung und Entsorgung

Die Urinprobe kann in dem Primärgefäß transportiert werden. Vorteilhafter ist jedoch der Transport und die Lagerung eines Aliquots in einem entsprechenden Sekundärgefäß.

Die Sekundärgefäße, welche für quantitative Analyse verwendet werden sollten ebenfalls lichtundurchlässig und gut verschließbar sein. Der Verschluss sollte dicht sein bei Tiefkühlung und während einer Zentrifugation mit 3000 x g (relative Zentrifugalkraft, RCF).

Das Sammelgefäß bzw. der verbleibende Urin sollte vom Patienten selbst entsorgt werden.

3.2.6 Gebrauchsanweisung

Zur Patientenvorbereitung ist neben der Einweisung des Patienten auch eine verständliche Gebrauchsanweisung zusammen mit dem Sammelgefäß auszuhandigen in der das Gesagte nachgelesen werden kann.

4 PROBENAUFBEREITUNG FÜR DIE BIOANALYTISCHE HPLC

4.1 Urin als Probenmatrix

Urin dient zur Regelung des Flüssigkeitshaushalts sowie zur Entsorgung von Harnstoff, Harnsäure und anderer Stoffwechsel-Endprodukte.

Urin wird in den Nieren produziert und konzentriert (Diurese), durch die Harnleiter in die Blase geleitet, dort gesammelt und schließlich über die Harnröhre abgegeben. Die Entleerung der Harnblase heißt Miktion.

Bei der Bildung in den Nieren und der Lagerung in der Blase ist Urin beim gesunden Menschen noch völlig keimfrei. Da die untere Harnröhre jedoch nicht keimfrei ist, enthält Urin beim Austritt bis zu 10.000 Keime pro Milliliter.

Die gelbe Farbe des Urins stammt von so genannten Urochromen, die Abbau-
produkte von Bilirubin darstellen.

Der pH-Wert des Urins liegt zwischen 4,5 und 8,0 und spiegelt die Zufuhr von Säuren und Basen mit der Nahrung wider [3]. Er ist bei vorwiegender Ernährung mit Fleisch sauer und bei pflanzlicher Ernährung alkalisch.

4.1.1 Zusammensetzung

Der menschliche Urin stellt als leicht zugängliche und in großen Mengen verfügbare biologische Flüssigkeit eine ideale Probenmatrix für nicht invasive bioanalytische Untersuchungen dar. Die Schwierigkeiten dieser Untersuchungsmatrix liegen aber in der extrem starken Heterogenität und Komplexität hinsichtlich der Zusammensetzung. Als physiologische Inhaltsstoffe kommen hunderte verschiedener chemischer Verbindungen in Betracht, die vornehmlich durch die individuelle Ernährung (pflanzliche und / oder tierische Kost), Alter, Geschlecht, und individueller Metabolismus bzw. Gesundheitszustand der untersuchten Person bestimmt wird. Auch der Konzentrationsverlauf der renal eliminierten Stoffe ist stark abhängig von der jeweiligen Tageszeit der Probenahme. Die durchschnittliche tägliche Urinmenge ist abhängig vom Geschlecht und beträgt bei einem gesunden Mann durchschnittlich 1,3 L und bei einer gesunden Frau ungefähr 1,1 L. Diese Durchschnittswerte können je nach Ernährungs- und Lebensgewohnheiten extrem stark schwanken (0,5 L – 2,7 L pro Tag). Die täglich ausgeschiedene Urinmenge enthält in etwa 60 g (50 – 72 g) an Trockensubstanz, die sich aus folgenden Komponenten zusammensetzt:

- 1/3 anorganische Bestandteile (z.B. Phosphate, Carbonate, Sulfate, Halogenide)
- 1/3 Harnstoff
- 1/3 weitere organische Verbindungen (siehe Tabelle)

In Tabelle 13 [159] sind die wichtigsten Inhaltsstoffe des Urins eines gesunden Menschen aufgeführt.

Tabelle 13: Ausgewählte Urinbestandteile und durchschnittliche tägliche Zusammensetzung nach [159]

Inhaltsstoffe	Ausscheidung pro Tag
Trockensubstanz [g]	50-72
Anorganische Stoffe [g]	20

Harnstoff [g]	20,6
Kreatinin [g]	1,5
Ammoniak [g]	0,7
Aminosäuren [g]	
gesamt	0,414
freie	0,160
Proteine (5-8 kDa) [mg]	30-120
Katecholamine	
Dopamin [µg]	200-400
Adrenalin [µg]	15-28
Noradrenalin [µg]	30-66
Porphyrine	
Koproporphyrine [µg]	60-280
Uroporphyrin III [µg]	28-63
Gallenfarbstoffe	
Urobilinogen [mg]	0,6-4
Bilirubin [mg]	0,02-1,9
Metanephrine	
Metanephrin [µg]	133
Normetanephrin [µg]	175
Harnsäure [mg]	528
Serotonin [µg]	131
5-Hydroxyindolessigsäure [mg]	4,5

Vanillinmandelsäure [mg]	5,7
Homovanillinsäure [mg]	4,2
nicht dialysierbare Stoffe [mg]	150-310
Proteine	10-30
Mucopolysaccharide	5-15
Kohlenhydrate [mg]	
reduzierte Zucker	0,5-1,5
Glucose	0,5
Organische Säuren [mmol]	55-64
Fette total [mg]	7-24
Triglyceride [mg]	1,6
Cholesterin [mg]	1,0
Phospholipide [mg]	4,5
Fettsäuren [mg]	2,2-7,4
Vitamine	
Folsäure [µg]	0,1-18
Pteridine [mg]	1,5-2,4
Riboflavin [mg]	0,3-2,5
Sediment	
Erythrozyten	105
Leukozyten	95
Tubuläre Zellen [$\times 10^3 \text{ h}^{-1}$]	140

In den Abbildung 17 und Abbildung 18 ist die prozentuale Zusammensetzung des menschlichen Urins auf das Trockengewicht der Urinbestandteile bezogen dargestellt. Die Abbildungen verdeutlichen den prozentualen Gewichtsunterschied zwischen den zu untersuchenden Analyten (Katecholamine) und den restlichen Matrixbestandteilen.

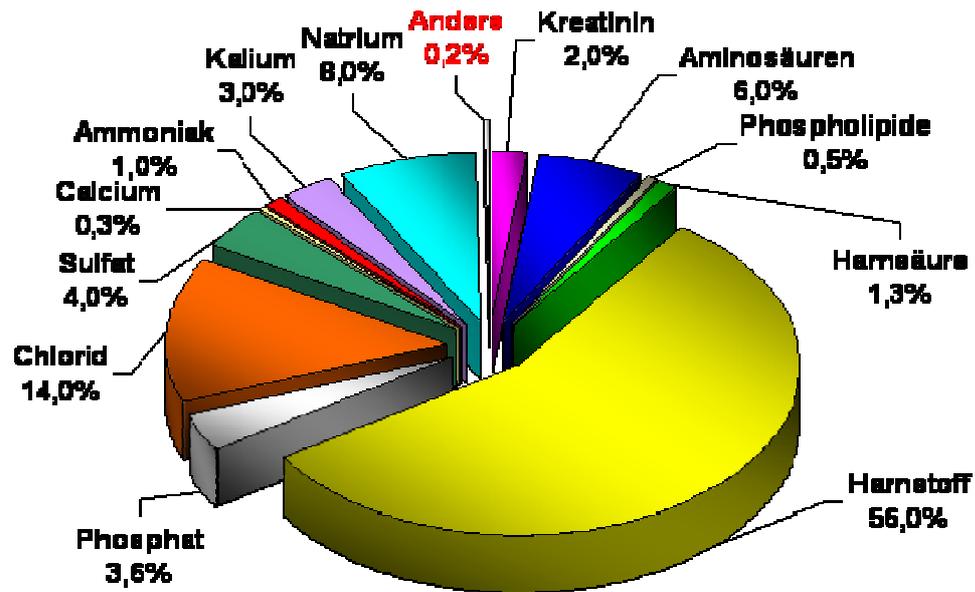


Abbildung 17: Zusammensetzung des menschlichen Urins. Die Prozente beziehen sich auf ~ 50 g Trockengewicht pro Liter Urin

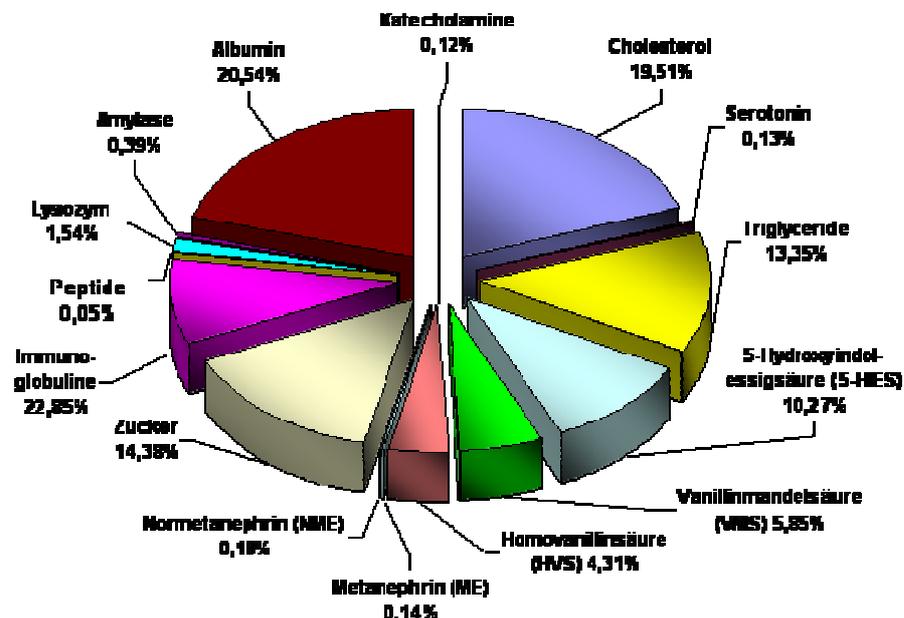


Abbildung 18: Zusammensetzung des menschlichen Urins. Die Prozen-
te beziehen sich auf ~ 0,1 g Trockengewicht (entspricht 0,2 % aus 50
g) pro Liter Urin

4.1.2 Bezugsgröße Kreatinin

Die Überprüfung der Vollständigkeit einer 24h-Urinsammlung ist Voraussetzung für die genaue Bestimmung einer Proteinurie, der Ausscheidungsrate von Natrium, Harnstoff, Calcium, Harnsäure, Oxalat, Citrat, Magnesium und Cystin sowie für eine Vielzahl von Hormonen wie z.B. Katecholamine und Steroide bei hypertensiven und endokrinen Erkrankungen [179]. Das Volumen des Urins kann wie oben erläutert, je nach zugeführter Flüssigkeitsmenge und körperlicher Betätigung zwischen 0,5 L und 2,7 L pro Tag schwanken. Um den Grad der Verdünnung der einzelnen Substanzen zu ermitteln, wird in der Bioanalytik eine Bezugsgröße eingeführt, die unabhängig vom Urinvolumen ist: der Kreatinin-Wert. Kreatinin ist das Stoffwechsel-

produkt von Kreatininphosphat, das als Energiereserve in den Muskeln vorliegt. Bestimmt wird Kreatinin vorwiegend mit Hilfe der Jaffé-Reaktion [146]. Die Vollständigkeit einer 24h-Urinsammlung kann nach der ausgeschiedenen Kreatininmenge geschätzt werden. Die Ausscheidungswerte für Erwachsene sind in Tabelle 14 angegeben. Für Kinder erfolgt die Berechnung nach folgender Gleichung: Urinkreatinin (mg/kg/24 h = 15,4 + (0,46 x Lebensalter in Jahren) [3]. Aber auch die tägliche Kreatinin-Ausscheidung kann stark schwanken, was den Bezugswert Kreatinin wieder etwas relativiert [147].

Tabelle 14: Kreatinin-Ausscheidungswerte für Erwachsene

Alter (Jahren)	Kreatinin im Urin (mg/kg/24 h)
20-29	23,8 ± 2,3
30-39	21,9 ± 1,5
40-49	19,7 ± 3,2
50-59	19,3 ± 2,9
60-69	16,9 ± 2,9
70-79	14,2 ± 3,0
80-89	11,7 ± 4,0
90-99	9,4 ± 3,2

4.1.3 Anforderungen an die Probenaufbereitung

Wie in den vorangehenden Abschnitten gezeigt wurde, setzt sich Urin aus einer Vielzahl an nieder- und makromolekularen Inhaltstoffen zusammen. Darüber hinaus liegen diese Substanzen in Mengen vor, die um ein mehrfaches höher sind (Faktor 10^3 - 10^6) als die in dieser Arbeit untersuchten Markermoleküle. Zu berücksichtigen ist auch, dass viele Matrixbestandteile oxidiert werden können, UV-aktiv sind oder sogar Eigenfluoreszenz zeigen. Gelingt es daher nicht, diese nieder- wie auch makromolekularen Verbindungen im Zuge der Probenaufbereitung quantitativ abzureichern, können sie im analytischen Chromatogramm zu Interferenzen führen. Des Weiteren können nicht entfernte makromolekulare Matrixbestandteile unspezifisch an das chromatographische Packungsmaterial adsorbiert werden. Dies führt zu einem Verlust an Selektivität und Kapazität des Trägermaterials gegenüber dem Analyten und dadurch zu einer verminderten Verfahrensstabilität und Zuverlässigkeit der Bestimmungsmethode.

Damit ein effizientes und sensitives bioanalytisches Nachweisverfahren nicht durch die starke Heterogenität und Komplexität der Matrix beeinträchtigt wird, sind folgende Anforderungen an die Aufbereitung des biologischen Untersuchungsmaterials zu stellen:

- Quantitative Fraktionierung der Probe in Analyt- und Matrixfraktion
- Abreicherung aller unerwünschten nieder- und makromolekularen Inhaltstoffe des Untersuchungsmaterials
- Quantitative Extraktion der Analyte aus der Matrix und Aufkonzentrierung
- Kompatibilität der Probenaufbereitungsmethode mit anderen Analyseverfahren (z.B. Flüssigkeitschromatographie, Massenspektrometrie)
- Automation und Routinetauglichkeit

4.2 Verfahren für die Aufbereitung biologischer Flüssigkeiten

Die Analyse von biologischen Flüssigkeiten, wie zum Beispiel Vollblut, Plasma, Serum, Urin, Liquor oder Milch, mittels HPLC wird dadurch erschwert, dass vor der analytischen Trennung die biologischen Proben in meist zeitintensiven und fehlerträchtigen Mehrschrittoperationen aufbereitet werden müssen [166, 167].

Der positive Einfluss einer effizienten Probenaufbereitung für die Routineanalytik biologischer Proben wurde schon früh erkannt. Daraufhin wurden verschiedene Methoden entwickelt, die eine möglichst selektive Abtrennung der Probenmatrix von den zu analysierenden Substanzen zum Ziel haben. Es sollen hauptsächlich makromolekulare Probenbestandteile (z.B. Proteine), die auf den analytischen Packungsmaterialien adsorbieren und präzipitieren könnten, und andere Matrixbestandteile, die die analytische Trennung stören könnten, vor der Analyse abgetrennt werden.

Die möglichen Aufbereitungstechniken biologischer Flüssigkeiten sind in Abbildung 19 schematisch dargestellt.

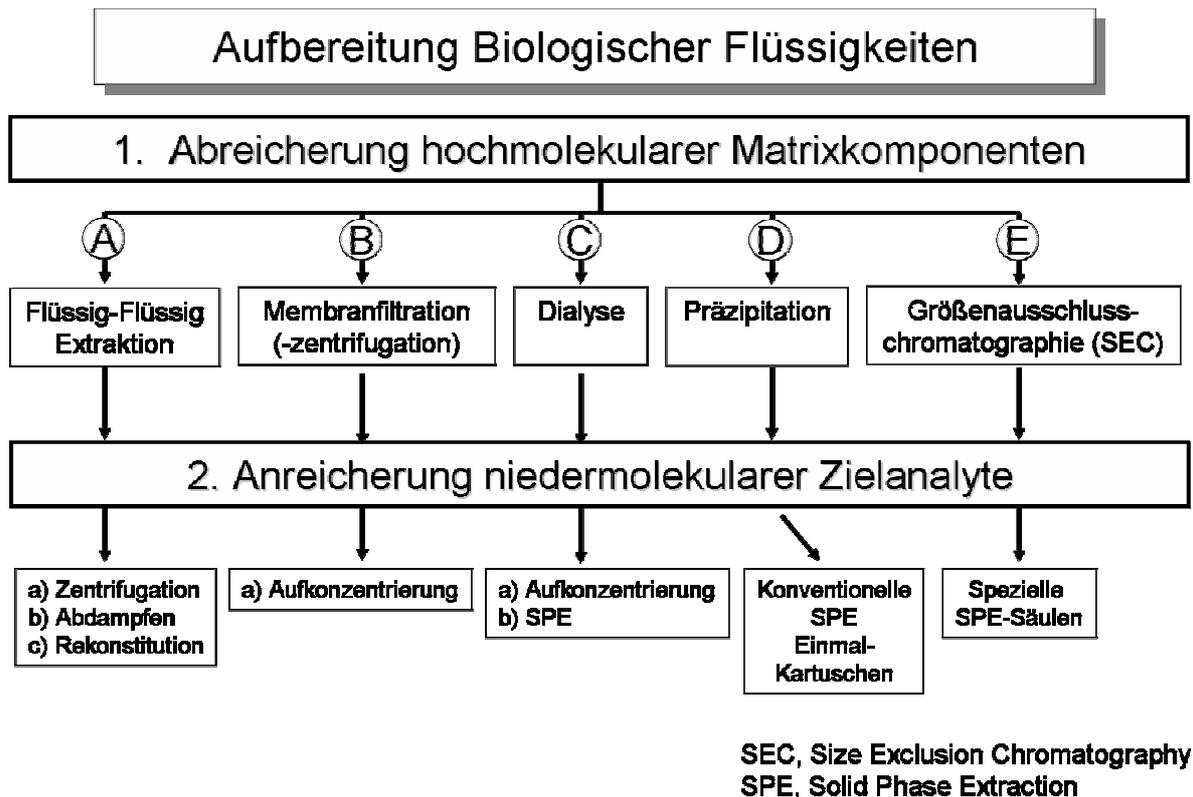


Abbildung 19: Aufbereitung biologischer Flüssigkeiten

4.2.1 Flüssig-Flüssig Extraktion

Die älteste Methode zur Aufbereitung biologischer Proben ist die Flüssig-Flüssig Extraktion. Sie geht auf den nach Stas und Otto benannten Trennungsgang zurück, der Mitte des 19. Jahrhunderts ausgearbeitet wurde [168]. Durch Ausschütteln eines mit Wasser nicht mischbaren Lösemittels werden die Analyte aus der Probenmatrix extrahiert. Die klassische Flüssig-Flüssig-Extraktion wird in einem Schütteltrichter durchgeführt. Eine Alternative hierzu stellt die Säulenelutionsmethode dar. Dabei wird die wässrige Probe auf eine mit Kieselgur gefüllte Extraktionskartusche aufgegeben. Während einer kurzen Einwirkzeit sickert die wässrige Probe in das poröse Trägermaterial ein. Anschließend werden die Analyte mit einem organischen, mit Wasser nicht mischbaren Lösemittel eluiert [169]. Die

Flüssig-Flüssig Extraktion wird auch heute noch zur bioanalytischen HPLC trotz gravierender Nachteile angewendet [170, 171], weil sie relativ einfach und weitverbreitet ist. Die Nachteile der Flüssig-Flüssig Extraktion sind:

- hoher Verbrauch an organischen Lösemittel
- die Auswahl an Lösungsmitteln sind limitiert
- großer Zeit- und Arbeitsaufwand, da viele Einengungsschritte nötig
- schlechte Wiederfindungsraten
- schlechte Reproduzierbarkeit
- schwer automatisierbar

4.2.2 Filtration / Dialyse

Bei der Filtration und Dialyse werden mit Hilfe einer Membran die makromolekularen Bestandteile der Probe von den niedermolekularen Inhaltstoffen abgetrennt, wobei die Größe der zur Penetration befähigten Teilchen durch die Porenweite der Membran bestimmt wird. Zur Filtration werden häufig Membranen mit einer Porenweite von 0,22 µm-0,45 µm eingesetzt [172].

Das Prinzip der Dialyse ist ähnlich dem der Filtration, jedoch befindet sich die aufzubereitende Probe in einer Probenkammer (z.B. Dialyseschlauch), die in eine mit Lösemittel gefüllte Kammer eingetaucht wird. Beide Flüssigkeiten sind nur durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt. Die niedermolekularen Analyte wandern aufgrund des Konzentrationsgefälles durch die Membran in das Lösemittel (Osmose) [173, 174]. Ein großer Nachteil der Dialyse ist die zusätzliche Verdünnung der meist niedrigen Analytkonzentration in der aufzubereitenden Probe. Darüber hinaus wird zur Einstellung des Dialysegleichgewichts verhältnismäßig viel Zeit benötigt, wodurch der Probendurchsatz erheblich minimiert wird.

Eine eventuell auftretende Adsorption der Zielanalyte an den Filter- bzw.

Dialysemembranen stellt ebenfalls eine potentielle Fehlerquelle dieses Probenaufbereitungsverfahrens dar.

4.2.3 Proteinpräzipitation

Die Präzipitation von Proteinen kann durch Zugabe von organischen Lösemitteln, Säuren oder Salzen erfolgen [175]. Im Anschluss werden die präzipitierten Proteine abzentrifugiert. Der proteinfreie Überstand kann nun in ein analytisches Trennsystem injiziert werden. Vorteile der Proteinfällung sind, dass diese universell einsetzbar ist sowie sehr einfach und schnell durchzuführen ist. Nachteil dieses Probenaufbereitungsverfahrens ist die mögliche Kopräzipitation oder Inklusion der zu analysierenden Substanz(en), wodurch die Wiederfindung der Analyte beeinträchtigt wird.

4.2.4 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (engl. SEC: Size-Exclusion Chromatography oder Gelfiltrationschromatographie, GFC) trennt die Moleküle nach ihrer effektiven Größe. Die hydrophile, poröse stationäre Phase wird mit wässrigen Eluenten unter isokratischen Bedingungen chromatographiert. Sehr große Proteine, die in die Poren nicht hineinpassen, werden ausgeschlossen und mit dem Totvolumen eluiert. Je kleiner die Moleküle sind, desto stärker werden sie über die längere Verweilzeit im Porensystem reteniert. Über die Wahl der Porengröße können Matrixbestandteile bestimmter Größe ausgeschlossen werden.

4.3 Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE)

Die Festphasenextraktion (Flüssig-Fest-Adsorption oder englisch: Solid Phase Extraktion, SPE) hat nach der Einführung unterschiedlicher Adsorbentmaterialien (Umkehrphasen, Ionenaustauscher, Affinitätsliganden) die Flüssig-Flüssig-Extraktion weitgehend abgelöst. Bei der Festphasenextraktion proteinhaltiger, biologischer Proben muss oftmals zunächst die Proteinmatrix durch Präzipitation abgetrennt werden. Bei diesem Arbeitsschritt können erste Analytverluste durch Kopräzipitation oder Inklusion auftreten. Anschließend wird die Probe auf die bereits konditionierte Extraktionskartusche aufgebracht und die Analyte an der Festphase adsorbiert. Durch verschiedene Spülschritte werden dann die Analyten von der Restmatrix befreit. Nach diesem Reinigungsschritt lassen sich mit Hilfe eines geeigneten Lösungsmittels die Zielanalyte von der Einmalkartusche eluieren. Nach dem abschließenden Einengen des Extraktes und Wiederaufnahme in dem Eluenten der analytischen Trennung, kann die Probe mit Hilfe der HPLC analysiert werden. Die extraktive Probenaufbereitung unter Verwendung einer porösen Festphase wird überwiegend manuell (off-line) durchgeführt (siehe Abbildung 20). Für die Bestimmung von Katecholaminen in biologischen Proben wurden unterschiedliche off-line SPE-Verfahren beschrieben siehe Kapitel 5.1.1.

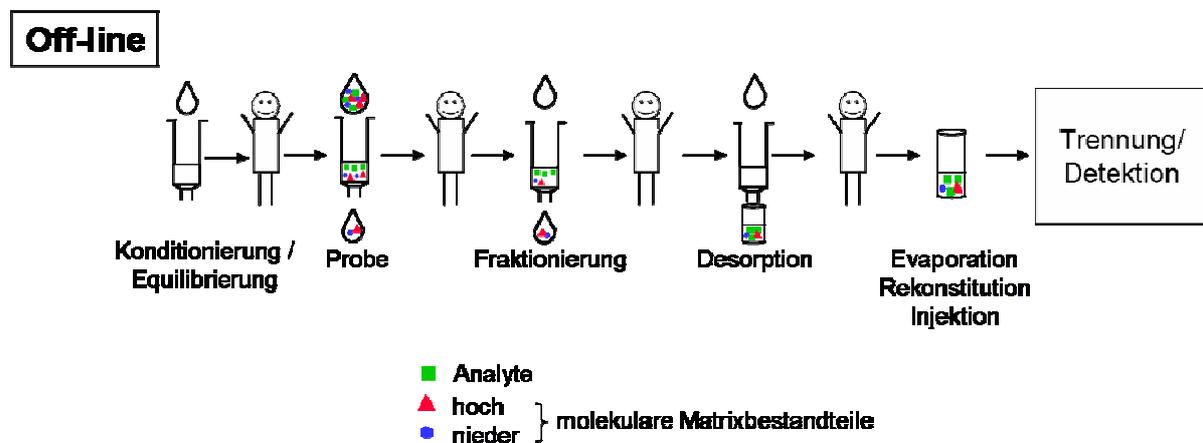


Abbildung 20: Verfahrenstechnik der Festphasenextraktion: „off-line“

4.3.1 Kriterien für eine optimale extraktive Probenaufbereitung

Um eine optimale extraktive Probenaufbereitung zu gewährleisten sollten bestimmte Kriterien erfüllt werden. Zum Beispiel sollte die SPE teilweise bzw. vollständig automatisiert sein. Der Probenaufbereitungsschritt sollte nicht geschwindigkeitsbestimmend sein. Das verwendete SPE-Material sollte eine möglichst quantitative Anreicherung eines breiten Spektrums von Analyten und eine möglichst vollständige Abreicherung unterschiedlicher Probenmatrices erlauben. Die Methodenentwicklung soll schnell und einfach durchführbar sein wobei sich die entsprechende Methode durch eine hohe Robustheit auszeichnen sollte.

4.3.2 Automation und Kopplung der SPE

Eine von Majors [110] im Jahre 1991 durchgeführte Umfrage unter HPLC-Anwendern ergab, dass auf die Probenaufbereitung biologischer Flüssigkeiten 61% der Gesamtanalysenzeit entfallen, während die anschließende HPLC-Trennung nur 6% der Gesamtzeit beansprucht. Auf das Datenmanagement entfallen 27% und auf die Probenahme 6% der Gesamtanalysenzeit. Die Probenaufbereitung beansprucht demnach die meiste Zeit einer Analyse einer biologischen Flüssigkeit. Aufgrund der ständig steigenden Analysenzahlen, die nicht nur genauer und schneller, sondern auch mit einem geringeren Personal- und Kostenaufwand bewältigt werden müssen, wurde in den letzten 15 Jahren verstärkt nach Möglichkeiten der Automatisierung der extraktiven Probenaufbereitung (SPE) gesucht. Erwünscht sind dabei vollständig automatisierte Analyseverfahren mit hohem Probendurchsatz bei gleichzeitiger Kosteneinsparung und einer Verbesserung der analytischen Qualität. Die Automation der SPE kann prinzipiell auf zwei Arten, d.h. at-line oder on-line

erfolgen. In Abbildung 21 sind diese Verfahrensweisen zur Automation der SPE dargestellt.

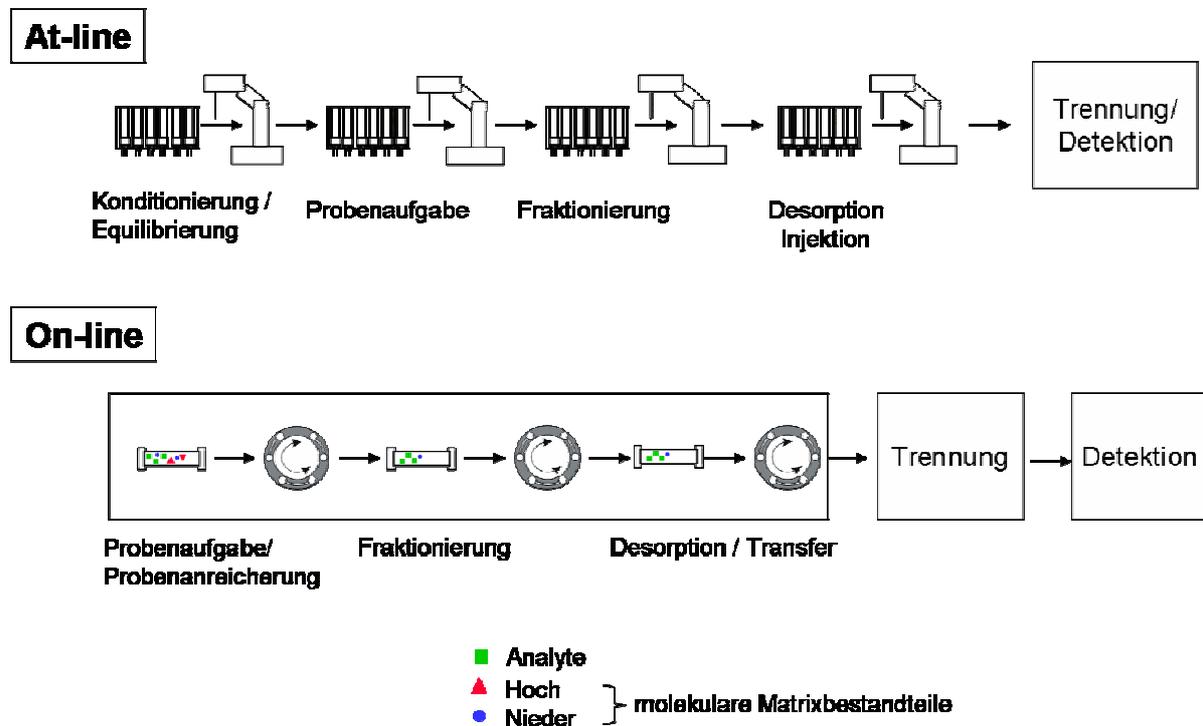


Abbildung 21: Modi operandi der Festphasenextraktion: „at-line“ und „on-line“

4.3.3 Automation durch „Roboter“ (at-line SPE)

Unter Niederdruckbedingungen können Teilschritte oder das vollständige Verfahren der konventionellen Festphasenextraktion (z.B. Konditionierung der Einmalkartuschen, Probenaufnahme, Auswaschen der Restmatrix, Einengen des Eluats und Injektion des eingengten Eluats in die HPLC) durch Pipettiersysteme „intelligente“ Probengeber, spezielle SPE-Automaten oder Roboter durchgeführt werden [116]. Als Nachteile sind bei dieser Art der Automation die sehr hohen Kosten für die Anschaffung der komplexen Geräte und die laufenden Kosten (SPE-Einmalkartuschen) zu nennen. Zwar werden die Analyseergebnisse schneller und reproduzierbarer erhalten, aber sie sind immer noch mit den gleichen Fehlern und

Einschränkungen behaftet wie bei der manuellen Durchführung der Festphasenextraktion.

4.3.4 Automation durch apparative Integration (on-line SPE)

Eine Alternative zur oben beschriebenen Automation stellt die so genannte Integration der Probenaufbereitung in den Analysenzyklus dar (on-line Modus). Hierbei ist die SPE-Einheit direkt mit der analytischen Einheit bzw. dem Detektor gekoppelt (siehe Abbildung 21). Derzeit stehen für diese on-line Kopplung zwei spezielle Geräte zur Verfügung:

Das Prospekt- und das Symbiosis-System (Spark Holland, Emmen, Niederlande) basieren auf speziellen Extraktionskartuschen (10 x 2 mm oder 10 x 3 mm), die unter Hochdruck betrieben werden können. Die neuere Symbiosis Anlage besteht aus einem „Probenhotel“, einem temperierten Probengeber, zwei Hochdruckpumpen, 2 Hochdruckkolbenpumpen und einer automatischen SPE-Kartuschen-Austausch-Einheit in der vier 6-Wege-Schaltventile integriert sind. Mit Hilfe eines Software-Programms und unter Verwendung unterschiedlicher SPE-Kartuschen, lässt sich auf einfache Weise das optimale SPE-Material herausfinden (XLC-Methode) und eine optimierte und vollständig automatisierte on-line Methode entwickeln (MD-Methode).

Die Vorteile dieser SPE-Automaten gegenüber den off-line und at-line Verfahren sind folgende:

- vollständige Automation
- erhöhter Probendurchsatz
- verbesserte Präzision
- schonende und schnelle Aufbereitung empfindlicher Proben

- erhöhte Nachweisempfindlichkeit, da die gesamte aufgearbeitete Probe analysiert wird
- sichere Handhabung von infektiösem Material (vollständig geschlossenes System)
- volle GLP (Good Laboratory Praxis) Tauglichkeit
- Parallele SPE und analytische HPLC Trennung
- Anwenderfreundliche, einfache Methodenentwicklung

Aber auch diese gekoppelten Systeme haben noch Nachteile. Die Instrumentierung ist sehr teuer und auch diese Systeme verwenden Einmalkartuschen.

Die extraktive Probenaufbereitung an einer porösen Festphase kann aber auch auf apparativ einfache und preiswerte Weise mit Hilfe einer so genannten SPE-Säule und eines konventionellen Schaltventils in ein HPLC-System integriert werden (siehe Abbildung 21). Die Verwendung solcher Zwei-Säulen Systeme, auch als Säulenschaltung oder LC-LC-Kopplung bezeichnet, wurde erstmals von Huber et al. [119, 120] zur Bestimmung von Östrogenen in Urin eingesetzt und fand aufgrund der einfachen Instrumentierung und Praktikabilität viele weitere Anwender [121, 122, 177, 124, 125, 126]. Die Problematik der beschriebenen Verfahren lag in der Verwendung von SPE-Säulen, die mit konventionellen Adsorbentien gepackt waren. Bei der direkten Injektion unbehandelter biologischer Flüssigkeiten auf derartige SPE-Kartuschen kommt es zu unspezifischen Adsorption und Denaturierung von makromolekularen Probenbestandteilen und somit zu einem Kapazitäts- und Selektivitätsverlust der eingesetzten SPE-Kartusche. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren spezielle maßgeschneiderte Adsorbentien entwickelt, die eine vielfach wiederholbare Injektion und LC-integrierte Extraktion unbehandelter biologischer Proben ermöglichen.

In Tabelle 15 sind die möglichen Arbeitstechniken der in Kapitel 4.2.1-4.2.4 vorgestellten Verfahren für die Aufbereitung biologischer Flüssigkeiten aufgeführt.

Tabelle 15: Arbeitsweisen

Technik	A	B	C	D	E
	Flüssig- Flüssig- Extraktion	Filtration	Dialyse	Protein- präzipitation	Größenausschluss- chromatographie
Methode	off-line	off-line	off- / on-line	off- / at-line	on-line

Die Techniken A-D lassen sich teilweise oder gar nicht automatisieren. Die Technik E lässt sich unter zu Hilfenahme spezieller SPE-Säulen im on-line Modus betreiben und somit vollständig automatisieren. Mittlerweile gibt es kommerziell erhältliche Geräte welche die Durchführung der on-line SPE gekoppelt an eine HPLC erlauben. Z.B. von der Firma Dionex, das Summit x2 Dual Gradient System, von der Firma Cohesive das Turbulent Flow System und von der Firma Shimadzu das erweiterte Prominence System.

Im folgenden Abschnitt werden die neuen und innovativen Materialien, welche als SPE-Säulen angewendet werden können, näher erläutert.

4.4 Maßgeschneiderte SPE-Materialien

4.4.1 Definition

„Restricted Acces“ Materialien (RAM) sind chromatographische Packungsmaterialien, die speziell zur Abtrennung und Anreicherung niedermolekularer Substanzen (z.B. Arzneistoffe) in komplexen biologischen Flüssigkeiten entwickelt wurden. Sie erlauben eine mehrfach wiederholbare Injektion unbehandelter biologischer Flüssigkeiten wie z.B. Plasma, Serum, Urin, Liquor oder ähnliche Matrices [127, 128, 129, 130]. Der Begriff „Restricted Access Sorbents“ wurde erstmals von Desilets et al. [131] eingeführt und beschreibt die aufgrund der Molekülgröße eingeschränkte Zugänglichkeit makromolekularer Probenbestandteile zu den Adsorptionszentren poröser Trägermaterialien. Das Prinzip der „Restricted Access“ Adsorbentien beim Einsatz in der HPLC-integrierten Probenaufbereitung beruht auf der simultanen Durchführung zweier chromatographischer Trennprozesse:

- Sterische Ausschlusschromatographie

Makromolekulare Probenkomponenten werden mit dem Totvolumen der SPE-Säule direkt in den Abfall geleitet.

- Adsorptionschromatographie

Niedermolekulare Analyte können adsorptiv gebunden und daher an der stationären Phase extrahiert bzw. angereichert werden.

4.4.2 Eigenschaften und Systematik von Restricted Access Materialien (RAM)

In den letzten 15 Jahren wurde die Entwicklung neuer „Restricted Access“ Materialien stark vorangetrieben. Mittlerweile sind viele verschiedene „Restricted Access“ Materialien kommerziell erhältlich. Aufgrund ihres Aufbaus weisen sie aber alle folgende Charakteristika auf:

- Definierte Ausschlussbarriere

Die eingeschränkte Zugänglichkeit („restricted access“) und dadurch der Größenausschluss makromolekularer Probenbestandteile kann entweder durch physikalische oder chemische Ausschlussbarrieren erreicht werden.

Der Aufbau einer physikalischen Ausschlussbarriere erfolgt durch die Wahl der Porengröße des verwendeten Trägermaterials. So bewirkt beispielsweise ein Porendurchmesser von 6 nm den vollständigen Ausschluss aller Makromoleküle mit einem Molekulargewicht größer 15000 Dalton vom Poreninneren (siehe Abbildung 22).

Bei der chemischen Ausschlussbarriere wird die eingeschränkte Zugänglichkeit zum Poreninneren durch ein polymeres Netzwerk, mit dem das Trägermaterial belegt ist, erreicht. Dabei bestimmt der Vernetzungsgrad des Polymers die Zugänglichkeit der Probenkomponenten zu den Adsorptionszentren. Das polymere Netzwerk besteht dabei aus kovalent oder adsorptiv gebundenen, synthetischen oder natürlichen Polymeren.

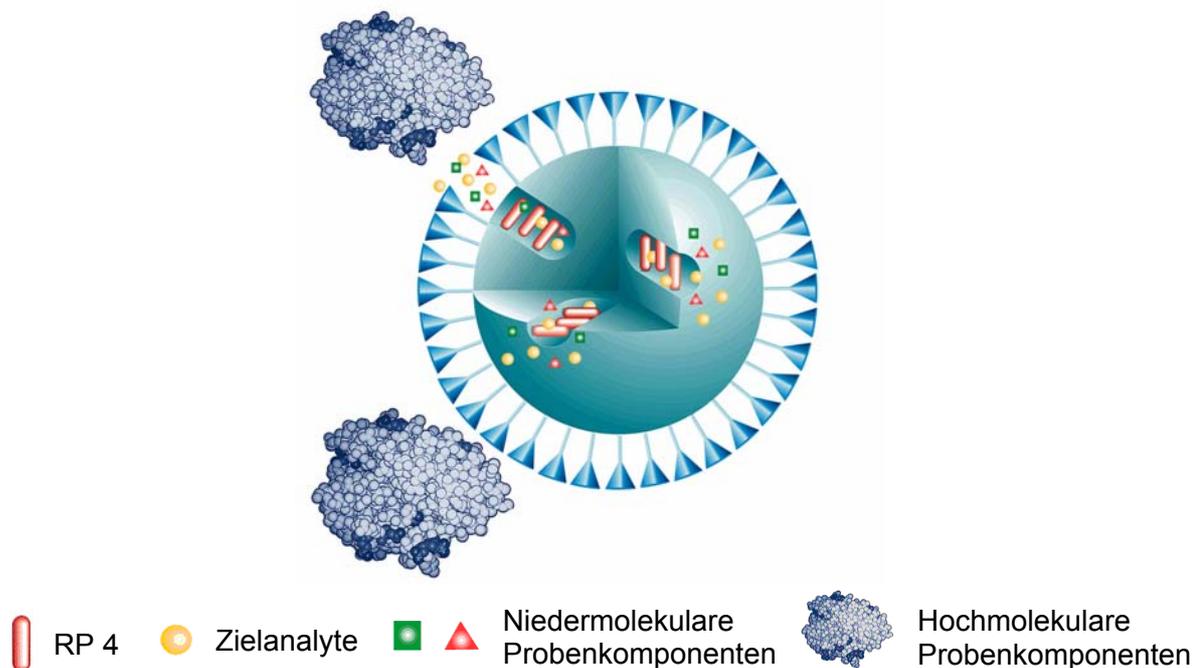


Abbildung 22: Schematische Darstellung eines „Restricted Access“-Adsorbens

- Biokompatible Außenoberfläche

Aufgrund der Kompatibilität der Außenoberfläche gegenüber biologischen Flüssigkeiten treten keine irreversiblen Wechselwirkungen zwischen den RA-Materialien und makromolekularen Probenbestandteilen wie z. B. Proteine, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate auf.

- Adsorptive Innenoberfläche

Niedermolekulare Probenkomponenten können aufgrund ihrer Größe ungehindert in die Poren eindringen und daher an einer adsorptiven Innenoberfläche (z.B. Umkehrphase, Ionenaustauscher oder Affinitätsliganden) durch selektive Wechselwirkungen extrahiert und angereichert werden.

Zur Klassifikation der RA-Materialien kann neben dem Strukturmerkmal der Ausschlussbarriere (physikalisch oder chemisch) als weiteres Kriterium die Topochemie des Trägermaterials herangezogen werden. Hierbei wird zwischen RAM mit einer einheitlichen Ligandenverteilung, das bedeutet uniformer Topochemie (siehe Abbildung 23, Typ A und C), und RAM mit dualer Oberflächenmodifizierung unterschieden (siehe Abbildung 23, Typ B und C). Bei Sorbentien mit dualer Topochemie befinden sich im Poreninneren unterschiedliche Liganden im Vergleich zur Außenoberfläche des Trägermaterials. In Abbildung 23 ist eine Übersicht und derzeit auf dem Markt befindlichen „Restricted Access“ Materialien aufgeführt.

innen	außen	Ausschlussbarriere	Oberflächen Topochemie	Typ	Produkte
		physikalisch	uniform	A	ChromSpher 5 Biomatrix (Chrompack) CAT-PBA (Recipe GmbH)
		physikalisch	dual	B	ISRP GFFII (Regis Technologies) LiChrospher ADS (Merck, WWR) LiChrospher XDS (Merck WWR)
		chemisch	uniform	C	Hisep (Supelco) Capcell Pak MF (Shiseido)
		chemisch	dual	D	Ultrabiosep (Shandon) BioTrap 500 (ChromTech) SPS (Regis Technologies) MAYI-ODS (Shimadzu)

Abbildung 23: Klassifikation der „Restricted Access“ Materialien [erweitert nach 132].

Die Restricted Access Materialien werden als Packungsmaterialien für spezielle SPE-Säulen verwendet. Die Dimensionen dieser Säulen liegen zwischen 20 und 50 mm und 4 bis 5 mm Innendurchmesser. Bei Verwendung dieser speziellen SPE-Säulen werden simultan zwei chromatographische Trennprozesse durchgeführt.

Der erste Prozess beruht auf der Ausschlusschromatographie (SEC). Aufgrund der eingeschränkten Zugänglichkeit werden hochmolekulare Probenbestandteile mit dem Totvolumen der SPE-Säule in den Abfall eluiert. Der zweite gleichzeitig stattfindende Prozess kann zum Beispiel die Umkehrphasenchromatographie (RPC), Ionenaustauschchromatographie (IEX) oder Affinitätschromatographie (AC) sein. Die niedermolekularen Probenbestandteile werden adsorptiv oder kovalent gebunden und somit extrahiert bzw. angereichert.

Tabelle 16 veranschaulicht an 3 Beispielen dieses Prinzip.

Tabelle 16: Aufbau, Typ und chromatographische Trennprozesse verschiedener RAM-SPE-Säulen

Säule Aufbau	RAM-SPE- poröses Trägermaterial	LiChrospher [®] ADS Typ B	LiChrospher [®] XDS Typ B	CAT-PBA Typ A
1.	poröses Trägermaterial	SEC	SEC	SEC
2.	immobilisierter Ligand innen und / oder außen	RPC	IEC	AC

Im Kapitel 6.2.2.1.1 wird genauer auf das in dieser Arbeit verwendete und von Boos et al. entwickelte „Restricted Access“ Material des Typs A (Cat-PBA) [164,165] eingegangen (vgl. auch Tabelle 16).

5 MODERNE METHODEN ZUR BESTIMMUNG VON KATECHOLAMINEN IN URIN

Die Katecholamine treten im Urin in der freien und konjugierten Form auf. Es überwiegen die sulfokonjugierten Katecholamine. Die Ausscheidungsrate der Konjugate von Noradrenalin und Adrenalin ist dreimal höher als der der freien Katecholamine [180,181]. Vor der Probenextraktion können die Konjugate unter Zugabe von Säure und Erwärmung oder enzymatisch z.B. mit Hilfe der Arylsulfatase hydrolysiert werden und in die Gesamtkatecholaminbestimmung eingeschlossen werden. Die meisten Untersuchungen über die klinische Bedeutung der Katecholamine schließen die Bestimmung der freien Katecholamine ein, da diese besser mit der Tumormasse des Phäochromozytoms korrelieren als die konjugierten Katecholamine [182].

Crout et al. [183] berichtet, dass die Einnahme von Bananen oder synthetischer Vanille die Ausscheidung der konjugierten Katecholamine erhöht [183]. Aus diesem Grund wird der Hydrolyseschritt normalerweise ausgelassen und nur die freien Katecholamine werden gemessen.

Die Vielzahl der Publikationen, die in den vergangenen Jahrzehnten zum Thema Katecholaminanalyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) erschienen sind, zeigen, dass heute primär HPLC-Methoden zur Bestimmung dieser diagnostisch aussagekräftigen, biogenen Amine (Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin vgl. Kapitel 2.1) herangezogen werden.

Die nachfolgenden Ausführungen geben einen Überblick über die Aufbereitung biologischer Matrices für die Analytik der Katecholamine, die benutzten stationären und mobilen Phasen zur Trennung und die eingesetzten Detektionsverfahren.

5.1 Probenaufbereitung

Nur wenige Publikationen [287, 263] beschreiben Methoden für die Katecholaminbestimmung aus Urinproben ohne Probenaufbereitung. Jedoch machen diese Methoden von unterschiedlichen Vorsäulen-Derivatisierungs-Verfahren Gebrauch. Dies bedeutet, dass die Gesamtanalysenzeit nicht kürzer ist als bei Verwendung einer Methode, die eine Probenaufbereitung beinhaltet.

Für die extraktive Probenaufbereitung sind verschiedene Adsorbentien beschrieben. Die Extraktion kann mit Hilfe von mit Phenylboronsäure (PBA) modifizierte SPE-Materialien, mit Ionenaustauschern und mit Aluminiumoxid erfolgen. Diese drei Probenaufbereitungsverfahren sind nach Automatisierungsgrad in Tabelle 17 aufgelistet.

Tabelle 17: Probenaufbereitungstechniken für die Katecholaminanalytik: zusammengestellt nach dem Grad der Automatisierung [nach 260]

	Extraktion über		
	Phenylboronsäure (PBA)	Ionenaustauscher	Aluminiumoxid
automatisiert	[210, 293, 295, 296], [274, 249], [276], [291], [277], [282]	[290], [266], [267], Kationen- und Anionenaustausch [288]	[279]
SPE nicht automatisiert	[270], starker Kationenaustauscher kombiniert mit PBA [268]	[269], [292], [264], SPE nach Hydrolyse [275], SPE nach Denaturierung [285, 286]	[272], [273], semiautomatisiert [297]
Flüssig-Flüssig-Extraktion nicht automatisiert	[283, 284, 298], [278, [271] (von Smedes et al. [196] entwickelt)		

5.1.1 Off-line Probenaufbereitung

Die Quantifizierung der Katecholamine Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin in biologischen Matrices setzt aufgrund der Komplexität der Matrices eine Präfraktionierung der biogenen Amine voraus. Unterschiedliche Extraktionsverfahren und Extraktionstechniken werden bei der manuellen (off-line) Probenaufarbeitung eingesetzt.

Anton und Sayre [189] führten eine Flüssig-Festphasen-Extraktion mit säureaktiviertem Aluminiumoxid ein. Bei pH-Werten größer 8,0 werden die Katecholamine aus den Matrices an das Aluminiumoxid adsorbiert. Die Desorption erfolgt durch Salzsäure, Perchlorsäure oder Essigsäure. Diese Extraktionstechnik führt in Abhängigkeit vom Aktivierungsgrad des Aluminiumoxids zu geringen Wiederfindungsraten der biogenen Amine, die durchschnittlich zwischen 60 % und 80 % liegen [190]. In Einzelfällen treten aber auch Werte zwischen 30 % bis 50 % auf [191]. In einer vergleichenden Studie zur Probenaufbereitung von Plasma mittels der Aluminiumoxidextraktionstechnik konnten Dirks et al. [192] zeigen, dass die Wiederfindung matrixabhängig ist. Ein weiterer Nachteil der Probenaufbereitung von Urin- und Plasmaproben mit Aluminiumoxid ist das Auftreten von Interferenzen im Chromatogramm. Wird im Anschluss an die manuelle Probenaufbereitung der Katecholamine eine HPLC-Trennung auf Umkehrphasen durchgeführt, kann es zur Koelution von Noradrenalin mit der durch das Aluminiumoxid nicht abgetrennten Harnsäure kommen.

Um diese Interferenzen auszuschalten wurde eine Zwei-Schritt-Extraktion durchgeführt. Zunächst erfolgt eine Vortrennung der Proben auf schwachen Ionenaustauschern (z.B. Bio-Rex 70) und anschließend die weitere Aufreinigung und Aufkonzentrierung an aktiviertem Aluminiumoxid [193]. Diese Methode findet verbreitete Anwendung trotz der Vielzahl der manuell auszuführenden Arbeitsschritte (vgl. Abbildung 24).

Die Aufreinigung der Katecholamine aus Plasma oder Serum erfolgt entweder durch Ultrafiltration bzw. Säurepräzipitation der Proteine und anschließender Ad-

sorption der Amine an der Kationenaustauscher-Säule. Die manuell auszuführenden Arbeitsschritte gestalten sich ähnlich komplex und zeitaufwendig wie für die Urinanalyse beschrieben (vgl. Abbildung 24).

Andere off-line SPE Verfahren zur Präfraktionierung der Katecholamine in biologischen Matrices setzen schwache Ionenaustauscher [215] Sephadex G10 [104] oder mit Boronsäure modifizierte Niederdruckgele [195] ein (vgl. Abbildung 25). Diese Extraktionsmethode kann mit einer geringeren Anzahl an manuellen Schritten durchgeführt werden, als die bereits erwähnte Zwei-Schritt Extraktionsmethode.

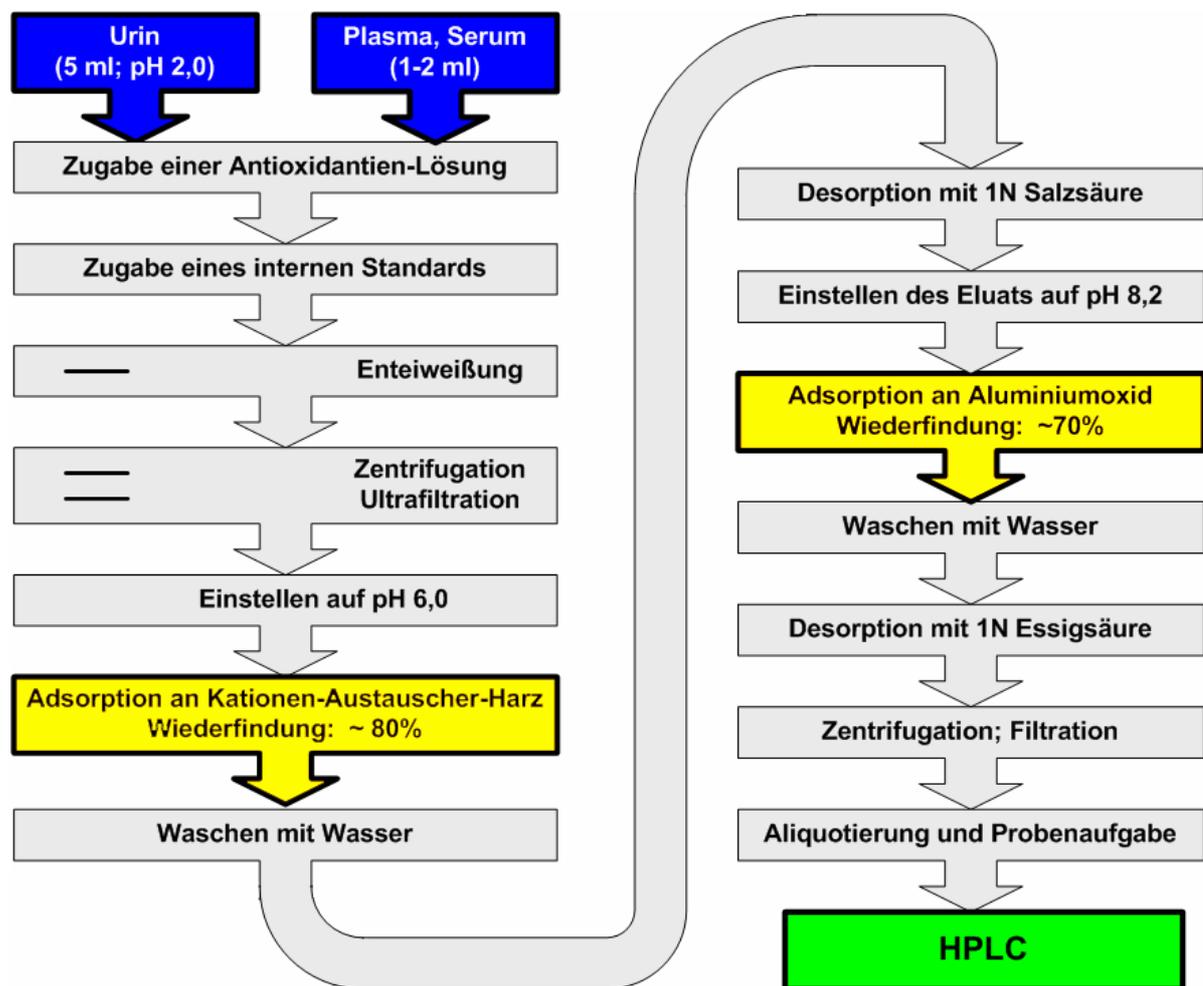


Abbildung 24: Analyseschritte für die Bestimmung der Katecholamine mittels off-line SPE (Kombination aus Ionenaustausch- und Adsorptionschromatographie)

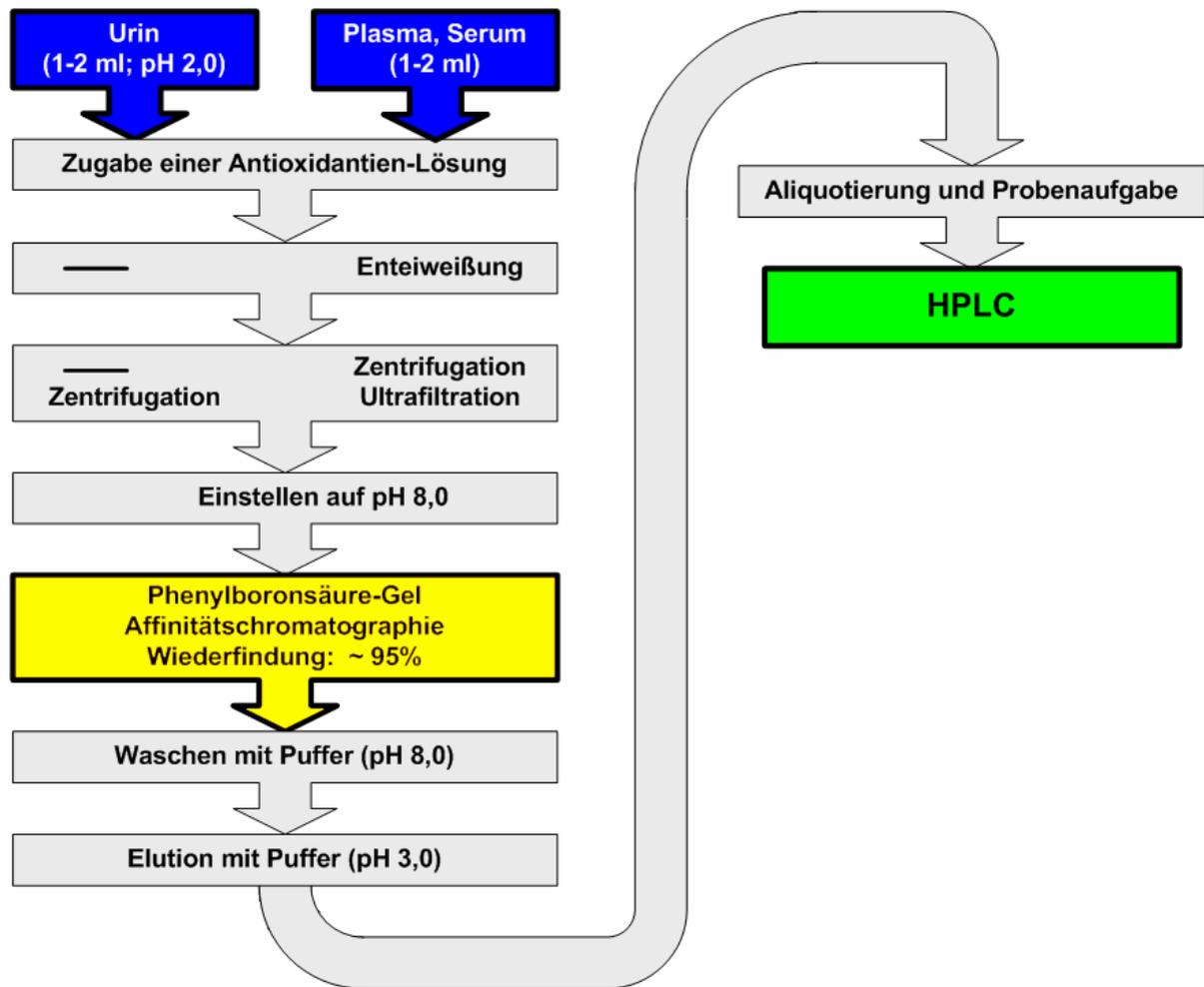


Abbildung 25: Analyseschritte für die Bestimmung der Katecholamine mittels off-line SPE (Affinitätschromatographie)

Eine Flüssig-Flüssig-Extraktion der Katecholamine unter Verwendung von Chloroform, n-Heptan und n-Octan beschrieben Smedes et al. [196] und Bauch et al. [197]. Hollenbach et al. [271] verwendet die von Smedes et al. beschriebene Methode und lässt die cis-Diol-Gruppe der Katecholamine im alkalischen mit Borationen ein Komplex bilden, welches durch Zugabe eines Ionenpaar-reagenzes in eine unpolare Phase (n-Heptan und Octanol) überführt und somit extrahiert werden kann.

5.1.2 On-line Probenaufbereitung

Die Probenaufbereitung ist vielfach das schwächste Glied in der modernen, mit Hochleistungsflüssigchromatographie betriebenen Routineanalytik. Die manuelle Präfraktionierung der Analyten aus biologischen Matrices gestaltet sich aufgrund der Vielzahl der auszuführenden Arbeitsschritte als arbeitsintensiv, zeitintensiv, kostenintensiv und fehlerträchtig (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25).

Der Einsatz von „SPE-Säulen“ zur Flüssig-Festphasen-Extraktion und der Transfer der präfraktionierten Analyten im on-line Modus auf eine analytische Säule mittels Säulenschaltung (siehe Kapitel 6.2) gestatten nicht nur die Automation der eigentlichen chromatographischen Prozesse (Probeninjektion, Trennung, Datenauswertung) sondern auch die der Probenaufbereitung. Dieses on-line Analysensystem sollte die Direktinjektion von nativen Proben erlauben.

5.1.2.1 Systeminterne Probenaufbereitung an Aluminiumoxid

Der Einsatz von Aluminiumoxid als stationäre Phase einer Vorsäule bzw. SPE-Säule zur systeminternen Präfraktionierung der Katecholamine aus Urin ist von Neidhart et al. [237, 241], Goto et al. [242] sowie DeJong et al. [100] publiziert. Die analytische Trennung der Katecholamine erfolgt durch Umkehrphasenchromatographie mit Perchlorsäure als Fließmittel [237, 241], auf Trennsäulen (150 x 0,5 mm I.D.) unter Ionenpaarchromatographischen Bedingungen [242] und durch Ionenaustausch- bzw. Ionenpaarchromatographie [100]. Zur Detektion der Katecholamine kommen Fluoreszenzdetektoren (Detektion der Katecholamine als

Trihydroxyindolderivate [237, 241], Detektion der natürlichen Fluoreszenz [100]), duale elektrochemische Detektoren [242] und einfache amperometrische Detektoren [100] zum Einsatz (vgl. Kapitel 5.2.1). Die Injektion von Plasmaproben ist, in mit Aluminiumoxid-SPE-Säulen arbeitenden multidimensionalen HPLC-Analysensystemen, nur nach vorangegangener Säurepräzipitation der Proteine möglich [100]. Eine systeminterne Adsorption der Katecholamine an das Aluminiumoxid führt - im Vergleich zur externen, manuellen Probenaufbereitung mit diesem Adsorbens - zu höheren Wiederfindungsraten, die aber ebenfalls vom Aktivierungsgrad des Oxids und den biologischen Matrices abhängen. Die Stabilität einer Aluminiumoxid-SPE-Säule ist für Urinalysen mit maximal 25 Injektionen [243] sehr begrenzt.

5.1.2.2 Systeminterne Probenaufbereitung an Phenylboronsäure

Eine weitere Möglichkeit der systeminternen Präfraktionierung der Katecholamine aus Urin liegt in der kovalenten Affinitätschromatographie an druckstabilen, mit Phenylboronsäure funktionalisierten Kieselgelen [100, 244-246]. Die analytische Trennung der Katecholamine wird auf Kationenaustauschern (Nucleosil 10 SA) [245, 246] oder unter ionenpaarchromatographischen Bedingungen [100] durchgeführt. Die Quantifizierung der biogenen Amine erfolgt durch amperometrische Detektion. Die direkte Injektion von proteinhaltigen Proben ist, wie für die Kationenaustauscher-SPE-Säulen und die Aluminiumoxid-SPE-Säulen, bei multidimensionalen HPLC-Systemen mit Phenylboronsäure-substituierten Kieselgel-SPE-Säulen ebenfalls nur nach systemexterner Proteinpräzipitation möglich [100]. Weitere Nachteile der Affinitätsgele auf Kieselgelbasis sind das Auftreten von Störpeaks im Chromatogramm durch das „Bluten“ der Phase und die in Abhängigkeit von der Anzahl der Injektionen stark abnehmenden Katecholamin-Bindungskapazitäten.

Ein anderes Analyseverfahren, welches zur systeminternen Probenaufbereitung und automatischen Katecholaminanalyse aus Urin und Plasma Phenylboronsäure-funktionalisierte Gele einsetzt, ist von Edlund und Westerlund [247] beschrieben. Das Analysensystem besteht aus zwei SPE-Säulen - die erste ist eine Boronsäure-affinitätsphase, die zweite eine C-18 Phase - einer analytischen Säule, drei Schaltventilen, einem coulometrischen Detektor zur elektrochemischen Detektion des Dopamins bzw. zur quantitativen Oxidation der Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin zu den entsprechenden Aminochromen (Adrenochrom und Noradrenochrom) und einem nachgeschalteten Reaktionssystem zur Trihydroxyindol-Nachsäulenderivatisierung (vgl. Abbildung 27). Bei der Direktinjektion von Plasmaproben in das komplex instrumentierte Analysensystem ist die erste SPE-Säule mit einem grobkörnigen, wenig druckstabilen, Phenylboronsäure-funktionalisierten Polyacrylamidgel (Affi-Gel 60) gepackt, welches nur die affinitätschromatographische Aufreinigung der Katecholamine ermöglicht. Eine Aufkonzentrierung der aus den Proben extrahierten Analyten erfolgt auf einer zweiten SPE-Säule unter ionenpaarchromatographischen Bedingungen. Die analytische Säule besteht aus einer Umkehrphase (C-18), auf der die Katecholamine durch Zusatz des Ionenpaarreagenzes Decylsulfat zu trennen sind. Noradrenalin und Adrenalin werden nach der elektrochemischen Oxidation und der intramolekularen Umlagerung in stark alkalischer Lösung in Form ihrer Trihydroxyindolderivate fluorimetrisch detektiert, während das Dopamin ausschliesslich coulometrisch erfasst wird. Die automatische Quantifizierung der Katecholamine aus Urin erfolgt durch den Austausch der Affinitätsphase (1. SPE-Säule) gegen ein mit Phenylboronsäure funktionalisiertes Kieselgel.

Dieses Analysensystem erlaubt erstmals die Direktinjektion einer eng begrenzten Anzahl von proteinhaltigen Proben [248] auf eine Phenylboronsäure-Affinitäts-Säule (Basismaterial Polyacrylamidgel). Limitierende Faktoren der automatischen Katecholaminanalyse aus Plasma sind die geringe Standzeit der ersten SPE-Säule und die wenig effektive Aufkonzentrierung der Amine auf der Affinitätsphase, was den Einsatz einer zweiten SPE-Säule erforderlich macht.

Eine weitgehende Automatisierung wird auch durch das Verwenden von SPE-Einmalkartuschen erreicht [274, 249, 277, 270].

Kleine, druckstabile Säulen, welche immobilisierte Phenylboronsäure als Affinitätsliganden enthalten sind von Boos et al. [210, 293], Eriksson et al. [276], Soga et al. [291] sowie Hansen et al. [282] in automatisierte Analysensysteme eingesetzt worden. Vorteile sind, dass diese spezielle „SPE-Säule“ eine spezifische Extraktion der Katecholamine erlauben, die Einbindung in das Analysensystem auf recht einfache Weise ermöglichen und darüber hinaus die Gesamtanalysenzeit signifikant reduzieren (siehe Kapitel 6.2.2.1.1).

5.1.2.3 Systeminterne Probenaufbereitung an RP-18 Phasen mit Ionenpaarreagenz

Der Transfer der für eine Flüssig-Flüssig-Extraktion der Katecholamine aus biologischen Matrices ausgearbeiteten Bedingungen auf eine Flüssig-Festphasen-Extraktion mit Umkehrphasenkartuschen, führte zur Entwicklung eines zweidimensionalen automatischen Katecholaminanalysators [249]. Diphenylboronsäure bildet unter alkalischen Bedingungen mit den Katecholaminen zyklische Ester aus [194], die stark von den mit dem Ionenpaarreagenz Tetrabutylammoniumbromid äquilibrierten C-18 Phasen der Einmalkartuschen reteniert werden. Nach dem „on-line“ Transfer der vorfraktionierten Katecholamine, wurden diese unter ionenpaarchromatographischen Bedingungen getrennt und mittels elektrochemischer Detektion quantifiziert.

Dieser Analysator ist aufgrund der vor jeder Injektion durchzuführenden Borsäureesterbildung (drei Pipettierschritte), dem Wechsel der C-18 Extraktionskartuschen zu jeder neuen Analyse, der sehr komplexen Instrumentierung und den Einsatz des elektrochemischen Detektors nur begrenzt in der Routineanalytik einsetzbar.

5.2 Trennverfahren (HPLC)

Die Analyse der Katecholamine mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) erfolgt im Allgemeinen in drei Schritten. Die Probenaufbereitung wie in Kapitel 5.1 näher erläutert, die Trennung und die Detektion der Katecholamine. Auf die Trennung und die unterschiedlichen Detektionsmethoden wird im folgendem näher eingegangen.

Die Katecholamine Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin sind basische Substanzen, die bei pH-Werten kleiner 5,5 an den Aminogruppen der Ethylseitenketten protoniert sind und über Kationenaustauscher getrennt werden können. Hallman et al. [198] setzten zur Trennung der aus Plasma präfraktionierten biogenen Amine einen starken Ionenaustauscher ein, der aus relativ großen, irregulär geformten Partikeln (Vydx CX) besteht. Die durch dieses Austauscherharz erzielten Chromatogramme weisen sehr breite und nur mäßig voneinander getrennte Peaks auf. Der Einsatz von feinkörnigeren, starken Kationenaustauschern (z.B.: Nucleosil 5 SA) mit Partikeldurchmessern von 5 μm bis 10 μm führte zu wesentlich besseren Trennungen [198, 199, 200-204]. Als mobile Phasen dienen bevorzugt Citrat-Acetatpuffer, pH 5,5 [199, 200, 201] oder Phosphatpuffer mit Acetonitril als organischem Modifier [204].

Ein häufig angewandtes Trennverfahren in der HPLC ist die Umkehrphasenchromatographie, die ebenfalls bei der Trennung der Katecholamine zum Einsatz kommt. Als erste nutzten Molnar und Horvath [205] die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen der unpolaren, stationären Phase und den aromatischen Aminen zur Trennung. Sie führten detaillierte Untersuchungen zum Retentionsverhalten der Katecholamine auf Umkehrphasen durch und stellten den signifikanten Einfluß des pH-Werts des Elutionsmittels auf die Trennung heraus, wohingegen die Ionenstärke nur schwache Effekte auf die k' -Werte zeigt.

Die Retention der unter sauren Bedingungen positiv geladenen Katecholamine an Umkehrphasen kann durch den Zusatz ionischer Detergenzien (Ionenpaar-

reagenzien) zur mobilen Phase stark erhöht werden. Diese Technik, welche die hohe Auflösung und die große Säulenstabilität der Umkehrphasenchromatographie mit der Ionenaustauschchromatographie kombiniert, wird als „Reversed Phase Ion Pair“-Chromatographie (RPIPC) bezeichnet. Sie ist ein, als Alternative zur Ionenaustauschchromatographie, zunehmend an Bedeutung gewinnendes Verfahren, das von Wittmer, Haney et al. [206, 207] sowie Knox et al. [208, 209] eingeführt wurde. Die Theorie sowie die experimentelle Durchführung der Ionenpaarchromatographie sind in Publikationen [211-214] beschrieben.

Die Retention und Trennung der Katecholamine an Umkehrphasen kann durch die Zugabe anionischer Detergenzien wie Heptansulfonsäure oder Octansulfonsäure zur mobilen Phase und gleichzeitiger Zumischung organischer Elutionsmittel wie Methanol oder Acetonitril moduliert werden.

Die Mehrzahl der heute zur Katecholaminbestimmung publizierten Applikationen, arbeiten mit Umkehrphasen und den oben aufgeführten Ionenpaarreagenzien. So wurden RPIPC-Methoden zur Quantifizierung der Katecholamine in Urin [210, 215-219, 249, 264, 268, 269, 270-272, 274, 275, 277, 279, 282, 285, 286, 290-293] Plasma [97, 220-222], Serum [223] und Liquor cerebrospinalis [224] beschrieben.

5.2.1 Detektionsverfahren

Für die Analyse der Katecholamine sind niedrige Nachweisgrenzen eine absolute Notwendigkeit, da die Konzentration der Zielanalyte im Urin im $\mu\text{g/L}$ und im Plasma im ng/L Bereich liegen. Daher werden meistens entweder Fluoreszenz-Detektoren oder elektrochemische Detektoren eingesetzt. Die UV-Detektion wurde zwar in früheren HPLC Methoden verwendet [184] ist aber nicht empfindlich genug.

5.2.1.1 Fluoreszenz Detektion (FD)

Die Katecholamine Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin können aufgrund ihrer natürlichen Fluoreszenz (Anregungswellenlängen, [Ex.] 270 bis 280 nm; Emissionswellenlängen, [Em.] 330 bis 360 nm) mit einem Detektionslimit von 300 pg [225] fluorimetrisch detektiert werden. Said el al. [279] quantifizieren die biogenen Amine im Urin unter Detektion der natürlichen Fluoreszenz. Tetracycline, Ampicillin und Erythromycin können aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz zu Interferenzen führen.

Die Quantifizierung der Katecholamine mit Fluoreszenzdetektoren erfolgt im Spurenbereich (ppb und ppt) durch Derivatisierung der Amine zu stark fluoreszierenden Produkten, d.h. diese Methoden sind empfindlicher als Methoden, die die natürliche Fluoreszenz detektieren [278]. Erfolgt die Derivatisierung vor der chromatographischen Trennung so wird eine Vorsäulen-Derivatisierung durchgeführt. Ist ein Reaktor zwischen dem Auslass der Trennsäule und dem Einlass des Fluoreszenzdetektors geschaltet (on-line) oder erfolgt die Derivatisierung in nach der Chromatographie gesammelten Fraktionen (off-line), so handelt es sich um eine Nachsäulen-Derivatisierung.

Die Mehrzahl der eingesetzten fluorogenen Reagenzien zur Vorsäulen-Derivatisierung der Katecholamine sind ortho-Phthalaldehyd (OPA) [226], Dansylchlorid (DNS-Cl) [227, 228], Fluorescamin [229] und 1,2-Diphenylethyldiamin (DPE) [230] (siehe Abbildung 26).

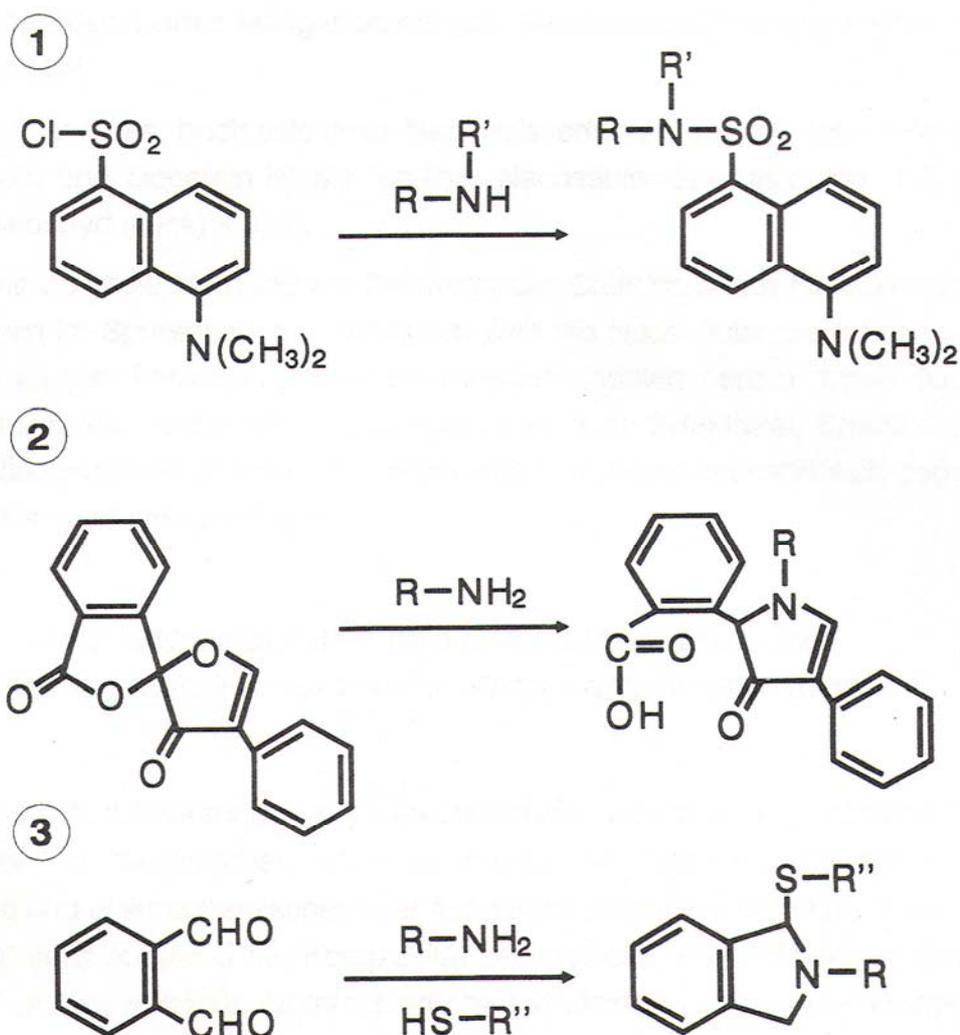


Abbildung 26: Reaktionen zur Vorsäulenderivatisierung der Katecholamine zu stark fluoreszierenden Produkten. (1) Dansylchlorid (DNS-Cl), (2) Fluorescamin, (3) Ortho-Phthalaldehyd (OPA)

1,2-Diphenylethylendiamin (DPE) wird als Vorsäulen-Derivatisierungsreagenz von Van der Hoorn et al. [283, 284] und als Nachsäulen-Derivatisierungsreagenz bei Nohta et al. [285, 286] eingesetzt. Später führten Nohta et al. [287] 2-Phenylglycinonitril und Benzylamin (BA) als Vorsäulen-Derivatisierungsreagenzien ein. Chan et al. [263] wenden 9-Fluor-enylmethyloxycarbonylchlorid als Vorsäulen-Derivatisierungsreagenz an.

Die empfindlichste und spezifischste Methode zur HPLC-Bestimmung der

Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin im Spurenbereich ist die on-line Nachsäulenderivatisierung durch die kontrollierte, oxidative Zyklisierung der Amine zu den entsprechenden Trihydroxyindolen (THI; Nachweisgrenzen von bis zu 1 pg [225]; siehe Abbildung 27). Viele Derivatisierungsmethoden sind Modifikationen der Lund THI-Methode [280]. Die Reaktion erfolgt in zwei Schritten: die Katecholamine werden zu ihren entsprechenden Adrenochromen oxidiert z.B. mit Hilfe von Kaliumhexacyanoferrat (III) und nachfolgender Zyklisierung im Alkalischen zu den fluoreszierenden 3,5,6-Trihydroxyindolen. Mit entsprechenden Reduktionsmitteln z.B. Ascorbinsäure [256] werden diese vor einer weiteren Oxidation, welche vor allem in alkalischer Lösung möglich ist, geschützt. Für Dopamin ist diese Nachweismethode nicht empfindlich genug [281].

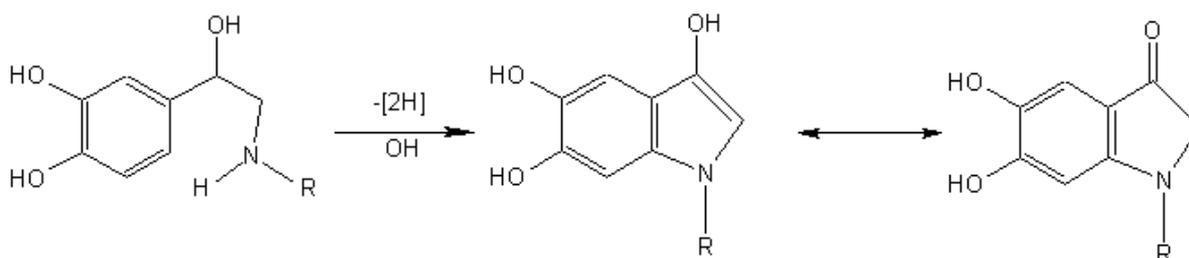


Abbildung 27: Generierung der Trihydroxyindole (R=H Noradrenalin; R=CH₃ Adrenalin)

Die ersten HPLC-Applikationen mit Nachsäulenderivatisierung der Katecholamine aus Urin zu den korrespondierenden Trihydroxyindolen wurden von Mori publiziert [231, 232]. Weitere Studien zu dieser Methode sind von Schwedt [233], Okamoto et al. [234] sowie Nelson et al. [235] durchgeführt worden. Die Quantifizierung von Noradrenalin und Adrenalin als Trihydroxyindolderivate im Pikogrammbereich haben Yui et al. beschrieben [203, 204, 225].

Zwei Typen von Reaktoren werden zur on-line Nachsäulenderivatisierung der Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin zu den entsprechenden Indolen eingesetzt: erstens homogene Reaktoren, bei denen das Oxidationsmittel Kaliumhexacyanoferrat-III als gepufferte Lösung zum Säuleneluat zugepumpt wird, und zweitens heterogene Reaktoren, die an Kieselgel adsorbiertes Mangandioxid

oder Bleidioxid als Oxidationsmittel nutzen [236, 237].

Als optimale HPLC-Methode zur Detektion der Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin in Urin-, Plasma- und Serumproben im Spurenbereich hat sich die Nachsäulenderivatisierung der Amine in einem on-line Reaktionssystem zu den korrespondierenden Trihydroxyindolen herausgestellt. Ein entsprechendes von Boos et al. [176-178, 210] entwickeltes, vollständig automatisiertes on-line Verfahren mit integrierter Probenaufbereitung (Direktinjektion) zeichnet sich durch seine hohe Selektivität, Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und die über einen weiten Konzentrationsbereich gegebene Linearität des Messsignals aus. Die Validität der Methode wird von Hansen et al. [282] nochmals bestätigt. Das Dopamin wird mit dieser Methode nicht erfasst.

Ein anderes, hochselektives Nachweisverfahren der primären Amine Noradrenalin und Dopamin ist die on-line Nachsäulenderivatisierung mit ortho-Phthalaldehyd (OPA) [226]. Adrenalin wird mit diesem Nachweisverfahren nicht erfasst, da es ein sekundäres Amin ist.

Seki et al. [288] setzten Glycylglycin als Nachsäulen-Derivatisierungsreagenz ein. Alle drei Hauptmetabolite können so detektiert werden. Die beschriebene Methode benötigt jedoch für die Regenerierung der ersten SPE-Säule über 50 min und ist somit nicht routinetauglich.

Kehr et al. [265] sind der Meinung, dass der Einsatz der Fluoreszenzdetektion einfacher und zuverlässiger ist und eine niedrigere Nachweisgrenze als die elektrochemische Detektion besitzt. Andere wiederum sind der Auffassung, dass die fluorimetrische Detektion wegen der Vielfalt von Derivatisierungsreagenzien variabler bzw. selektiver ist [289].

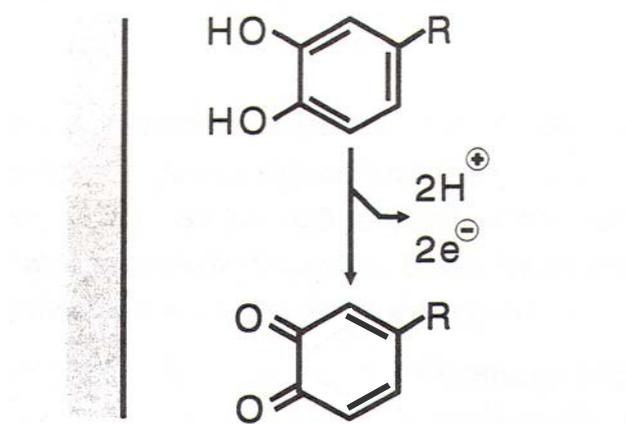
5.2.1.2 Elektrochemische Detektion (ECD)

Der erfolgreiche Einsatz einer elektrochemischen Flusszelle als Detektor zum Nachweis elektrooxidabler Substanzen in Säuleneffluenten wurde von Kissinger et al. erstmals publiziert [191].

Zwei Typen elektrochemischer Detektoren sind zu unterscheiden: erstens coulometrische Detektoren, die bei vorgegebenem Oxidationspotential die elektroaktiven Moleküle quantitativ anodisch oxidieren und zweitens die amperometrischen Detektoren, die weniger als 10 % der entsprechenden Moleküle umsetzen. Der durch die Oxidationsreaktion gebildete Strom ist das Detektorsignal, welches bei coulometrischen Detektoren wesentlich höhere Werte erreicht als bei amperometrischen. Gleichzeitig nimmt aber mit steigender Stromausbeute der Rauschpegel der Detektoren zu. Die Sensitivität der beiden elektrochemischen Detektortypen ist aufgrund übereinstimmender Signal-Rausch-Verhältnisse gleich. Der weniger komplex aufgebaute amperometrische Detektor wird bevorzugt in der Klinischen Chemie eingesetzt.

Die Elektrode wird auf einem konstanten Arbeitspotential [190] gehalten. Die geminalen OH-Gruppen der Katecholamine werden an der Arbeitselektrode der elektrochemischen Detektoren bei Oxidationspotentialen um + 600 mV zu den entsprechenden Chinonen (siehe Abbildung 28) oxidiert. Die bei der Oxidation freiwerdenden Elektronen werden von der Elektrode als resultierender Strom gemessen. Elektrochemische Detektoren zum Nachweis der Katecholamine in Urin [218, 219], Plasma [97, 198, 201], Serum [123] und Liquor cerebrospinalis [224] finden heute verbreitet Anwendung. Die Nachweisgrenzen dieser Detektoren sind mit 25 pg [225] bis 2 pg für die Analyse der Amine in den aufgeführten Körperflüssigkeiten ausreichend. Neuere Entwicklungen führen zu dualen elektrochemischen Detektoren, die zur Quantifizierung der biogenen Amine in Urin [238] und Serum [239] eingesetzt werden. Sarzanini et al. [266] verwendet für die Bestimmung der Katecholamine im Urin einen dualen coulometrisch-amperometrischen Detektor. Einen elektrochemischen Detektor mit acht Kanälen wird von

Mashige et al. [267] eingesetzt.



R=	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	Dopamin
	$-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	Noradrenalin
	$-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$	Adrenalin

Abbildung 28: Anodische Oxidation der Katecholamine zu den entsprechenden Chinonen.

Der Hauptvorteil des elektrochemischen Detektors in der HPLC-Bestimmung der Katecholamine ist die hohe Empfindlichkeit und die relativ kostengünstige Anschaffung des Gerätes. Andererseits reagiert der elektrochemische Detektor mit allen Verbindungen, die bei einem gegebenen Potential der Arbeitselektrode oxidiert werden können. Dies wiederum erhöht das Risiko von im Chromatogramm auftretenden Interferenzen und macht eine intensive Wartung des Detektors nötig [265].

Die Anwendung der von Surmann [240] aufgeführten Kriterien zur Beurteilung der in der HPLC eingesetzten Detektoren verdeutlicht, dass die elektrochemische Katecholamin-Detektion nur eingeschränkt als Methode der Wahl betrachtet werden kann. Elektrochemische Detektoren verfügen zwar wie bereits oben erwähnt über

die erforderliche Empfindlichkeit, Selektivität und Linearität des Messsignals für die Katecholaminanalyse im Spurenbereich, die Kriterien Stabilität, Reproduzierbarkeit und Kompatibilität des Detektors mit unterschiedlichen analytischen Systemen sind aber nur bedingt erfüllt. So wirken sich beispielsweise geringe Temperaturschwankungen, geringe Schwankungen der Durchflussgeschwindigkeit des Eluenten in der Messzelle (z.B. Flussgradienten, Pumpenpulsationen), pH-Wertschwankungen (pH-Schrittelution), organische Komponenten im Fließmittel (Methanol, Aceton, Acetonitril) und einige Arten von Puffersalzen negativ auf die Sensitivität der elektrochemischen Detektion [240] aus. Auch sind die Elektrodenoberflächen störanfälliger als UV- und Fluoreszenz-Detektoren.

Demnach sind HPLC-Methoden mit elektrochemischer Detektion bis heute sehr beliebt und weit verbreitet. Dies gilt sowohl für eine amperometrische [268, 269, 270, 271] als auch für eine coulometrische [274, 249, 276, 277, 278, 272, 273] Detektionweise.

5.2.1.3 Massenspektrometrische Detektion (MS)

Es gibt bis jetzt eine einzige – von Chan und Ho [264] beschriebene – HPLC Methode, die einen Massenspektrometer als Detektor benutzt. Diese LC-MS Kopplung verwendet eine Ionenquelle, die unter Atmosphärendruck (API: atmospheric pressure ionisation) arbeitet. Diese Technik wird vom Autor auch in [263] diskutiert. Nach Meinung des Autors erhöht diese Detektionsmethode die Empfindlichkeit, die Selektivität und die analytische Robustheit.

5.3 Weitere analytische Methoden zur Bestimmung der Katecholamine im Urin

Die im folgenden aufgeführten immunochemischen, kapillarelektrophoretischen und fluorimetrischen Methoden sind nicht so gebräuchlich bzw. validiert wie die HPLC Methoden [260].

5.3.1 Immunoassays

Die kommerzielle Entwicklung von robusten Immunoassays für die Bestimmung der Katecholamine in Urin und Plasma erfolgte über einen langen Zeitraum. Grund hierfür war überwiegend die schwierige Gewinnung von Antikörpern bedingt durch das niedrige Molekulargewicht und die leichte Oxidierbarkeit der Analyten.

Murphy et al. [259] beschreibt einen ELISA-Test („enzymelinked immuno sorbent assay“) welcher monoklonale Antikörper für Adrenalin und Noradrenalin verwendet. Diese Methode wurde jedoch nicht für biologische Proben beschrieben.

Kennedy und Ziegler [258] beschreiben eine Modifikation eines radioenzymatischen Assays für Noradrenalin und Adrenalin in Plasma-, Urin- und Gewebeproben.

Die derzeit kommerziell erhältlichen ELISA Verfahren benötigen zusätzliche Extraktions- und Derivatisierungsschritte [187, 188].

Die Extraktion erfolgt affinitätschromatographisch an mit Boronsäure modifizierten Niederdruckgelen oder beschichteten Makrotiterplatten. Anschließend werden die

extrahierten Katecholamine mit Bolton-Hunter Reagenz acyliert und mit Hilfe der Catecholamin-O-Methyltransferase (COMT) in Gegenwart von S-Adenosylmethionin zu 3-Methoxytyramin, Normetanephrin und Metanephrin methyliert. Danach erfolgt erst die eigentliche immunologische Reaktion. Die Immunoassays korrelieren relativ gut mit entsprechenden HPLC-Verfahren.

5.3.2 Kapillarelektrophorese (CE)

Kürzlich sind kapillarelektrophoretische Methoden zur Quantifizierung von Katecholaminen im Urin veröffentlicht worden. Zhu und Kok [250] beschreiben eine Methode worin über Aluminiumoxid die Katecholamine von der Urinmatrix extrahiert werden. Nachfolgend werden sie über die Kapillarelektrophorese die mit Puffer arbeitet in dem Borat-Ionen zugesetzt sind, getrennt. Der Nachsäulen-Derivatisierung folgt die Lumineszenz Detektion. Sirén und Karjalainen [251] hydrolysieren die Urinproben mit einer Säure oder Base bevor sie in das kapillarelektrophoretische System injiziert wird. Die Detektion erfolgt über ein Photodiodenarray. Die weiteren Arbeiten der Arbeitsgruppe Siren et al. [252, 253, 254] sowie die Übersichtsarbeit von Baena et al. [255] beschreiben weitere Optimierungsversuche bezüglich Detektion und Probenaufbereitung. Eine weitere Variante beschreibt Chen et al. [261]. Hier erfolgt die Bestimmung der Katecholamine im Urin mittels Kapillarelektrophorese und elektrochemischer Detektion. Dabei wird eine spezielle Elektrode verwendet, die eine höhere amperometrische Sensitivität aufweist [262].

5.3.3 Fluorimetrische Methoden

Fluorimetrische Messungen erlauben es die Katecholamine zu unterscheiden und zu quantifizieren ohne vorrausgegangene HPLC-Trennung. Die beiden hier erwähnten Methoden messen die Fluoreszenz der Trihydroxyindole (THI) [256, 257] und detektieren somit nur Adrenalin und Noradrenalin. Von Llaverro et al. [256] wird ein manuelles Probenaufbereitungsverfahren von der Firma Biosystems Laboratories eingesetzt, welches bereits gepackte, schwach saure Kationenaustauscher-Säulen benutzt. Cañizares und Luque de Castro [257] automatisierten dieses Verfahren. Cañizares und Luque de Castro [257] verwendeten die Fluoreszenzspektren der Trihydroxyindolderivate. Llaverro et al. [256] hingegen benutzten die Bildungskinetik der Derivate.

6 EXPERIMENTELLER TEIL MIT DISKUSSION

6.1 Präanalytik harngängiger Markermoleküle

Um die Präanalytik harngängiger Markermoleküle (siehe Kapitel 2) wie der Katecholamine Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin, deren Metabolite Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure, Metanephrin und Normetanephrin sowie des Serotonins und dessen Metabolit 5-Hydroxyindolessigsäure zu standardisieren, wurden die im folgenden beschriebenen experimentellen Untersuchungen durchgeführt. Hierzu gehörte unter anderem die Überprüfung der Stabilität dieser Markermoleküle im 24h-Sammelurin bei unterschiedlichen pH-Werten und bei Zusatz von entsprechenden Stabilisatoren. Darüberhinaus wurden Studien mit Probanden und Patienten durchgeführt, um ein geeignetes, patientenfreundliches Sammelgefäß zu entwickeln.

6.1.1 Stabilität

Wie aus Kapitel 2 ersichtlich galt es folgende Fragen zu überprüfen:

- (1) Über welchen Zeitraum ist der 24h-Sammelurin bei Raumtemperatur stabil ?
 - a. ohne zugesetzten Stabilisator und
 - b. mit zugesetzter Salzsäure als Stabilisator
- (2) Welcher eingestellte pH-Wert des 24h-Sammelurins ist optimal für die nachfolgende Bestimmung der Markermoleküle?
- (3) Welche Menge bzw. welche Konzentration an Säure muss vorgelegt bzw. zugesetzt werden, um diesen optimalen pH-Wert in einem 24h-Sammelurin zu erreichen?
- (4) Über welchen Zeitraum sind die Analyten in einem 24h-Sammelurin bei Raumtemperatur stabil?
 - a. ohne zugesetzten Stabilisator und
 - b. mit zugesetzter Salzsäure als Stabilisator

6.1.1.1 pH-Shift

Bei 1458 Spontanurinen von Patienten wurde der pH-Wert mit Hilfe von Sticks gemessen. 64,4% lagen bei pH 5 oder kleiner; 10,3% bei pH 6; 15,2% bei pH 7; 9,7% bei pH 8 und 0,4 % bei pH 9.

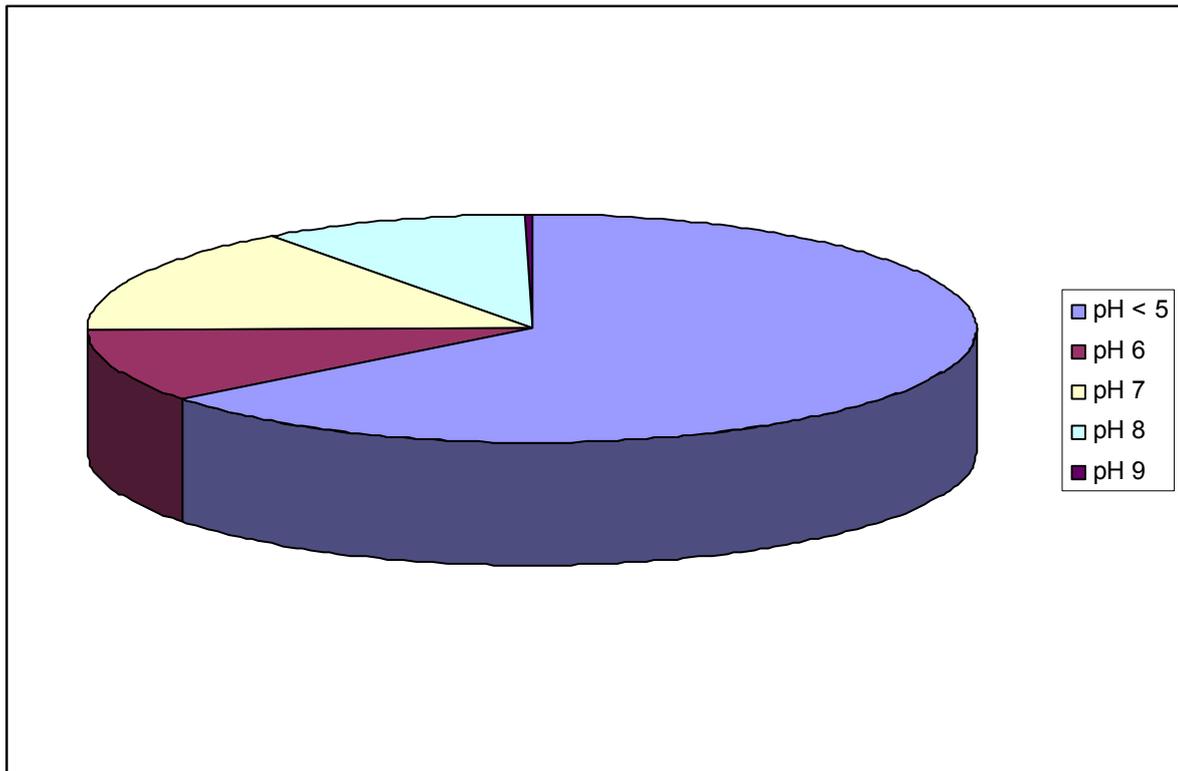


Abbildung 29: Prozentuale pH-Wert Verteilung von insgesamt 1458 Spontanurinproben

Abbildung 30 veranschaulicht die pH-Stabilität eines 24h-Urin-Pools bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 14 Tagen. Dieser Urin-Pool setzte sich aus 11 24h-Sammelurinen von erwachsenen, männlichen Probanden zusammen und hatte einen pH-Wert von 6,5.

Dieser Urinpool wurde nach 1 monatiger Lagerung bei -20°C aufgetaut. Zwanzig 100 mL Aliquote wurden auf unterschiedliche pH-Werte (0; 0,5; 1,0; 1,5; 1,75; 2,0; 2,25; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0) mit einer kalibrierten pH-Elektrode, jeweils mit Natronlauge oder Salzsäure eingestellt. In der Abbildung 30 entspricht dies Tag 0. Täglich wurde der pH-Wert der bei Raumtemperatur gelagerten Aliquote bestimmt.

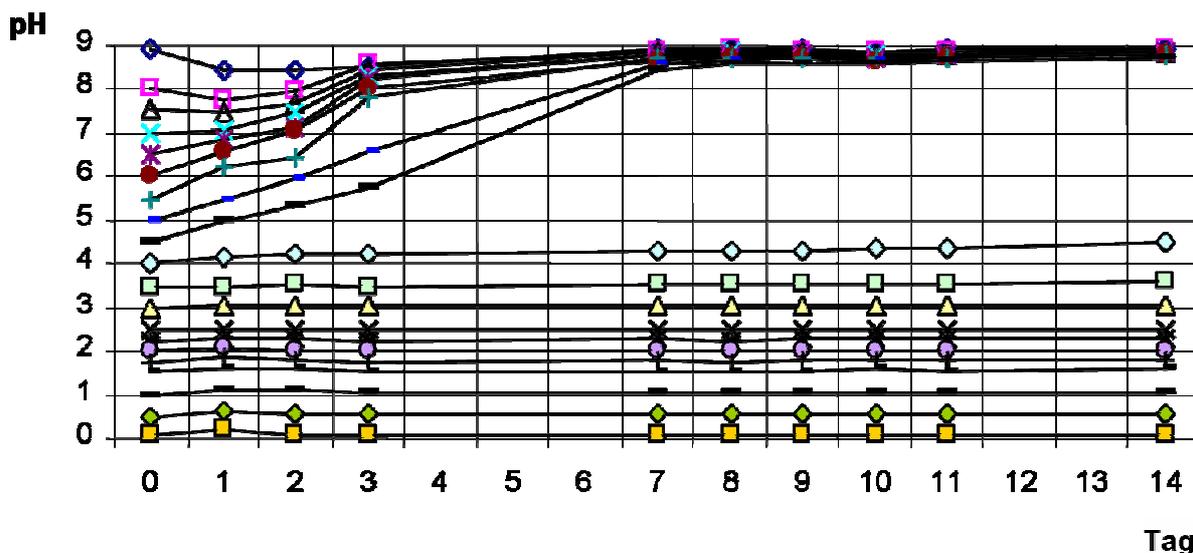


Abbildung 30: Zeitabhängige pH-Veränderung in titrierten 24h-Sammelurin-Poolproben bei Raumtemperatur

Die obige Abbildung zeigt, dass in den auf pH < 4 angesäuerten Aliquots keine pH-Änderung erfolgt.

In den Urinproben mit pH 4,5 bis 9 ist ein Anstieg des pH-Wertes zum alkalischen hin schon in den ersten 24 Stunden zu erkennen, wobei am Tag 3 noch nicht das Maximum erreicht ist. Wie im Kapitel 4.1 bereits erwähnt liegt der pH-Wert von nativem Urin zwischen 4,5 bis 8. Nativer 24h-Sammelurin ist jedoch wie die Untersuchung zeigte nicht pH-stabil. Der Grund hierfür liegt darin, dass Urin durch die Kontamination mit Bakterien, welche Ammoniak bilden, nach einer gewissen Zeit alkalisch wird. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass die Katecholamine insbesondere unter alkalischen Bedingungen sehr leicht oxidiert werden. Es galt daher zunächst zu überprüfen, ob die von Boomsma et al [115] getroffene Aussage bzw. Empfehlung, dass die Katecholamine über 4 Tage bei Raumtemperatur stabil sind zutrifft.

Dazu wurden von 10 Probanden 24h-Sammelurine gewonnen. Diese Urine wurden nicht eingefroren sondern aliquotiert. Die Aliquots wurden auf pH-Werte von 2,5-5 eingestellt und 10 Tage lang bei Raumtemperatur gelagert werden. Der pH-Wert wurde mittels pH-Elektrode über diesen Zeitraum überprüft (Abbildung 32 bis

Abbildung 41). Aus den 10 24h-Sammelurine wurde auch ein Urinpool hergestellt (Abbildung 31) und genauso wie die Einzelurine behandelt. Das Sammelvolumen der 24h-Urine variierte von 1,1 L bis 3,3 L. Die Kreatininwerte lagen alle im akzeptablen Bereich von 0,9-1,8 g/24h wobei der Richtwert 0,6-2,1 g/24h beträgt.

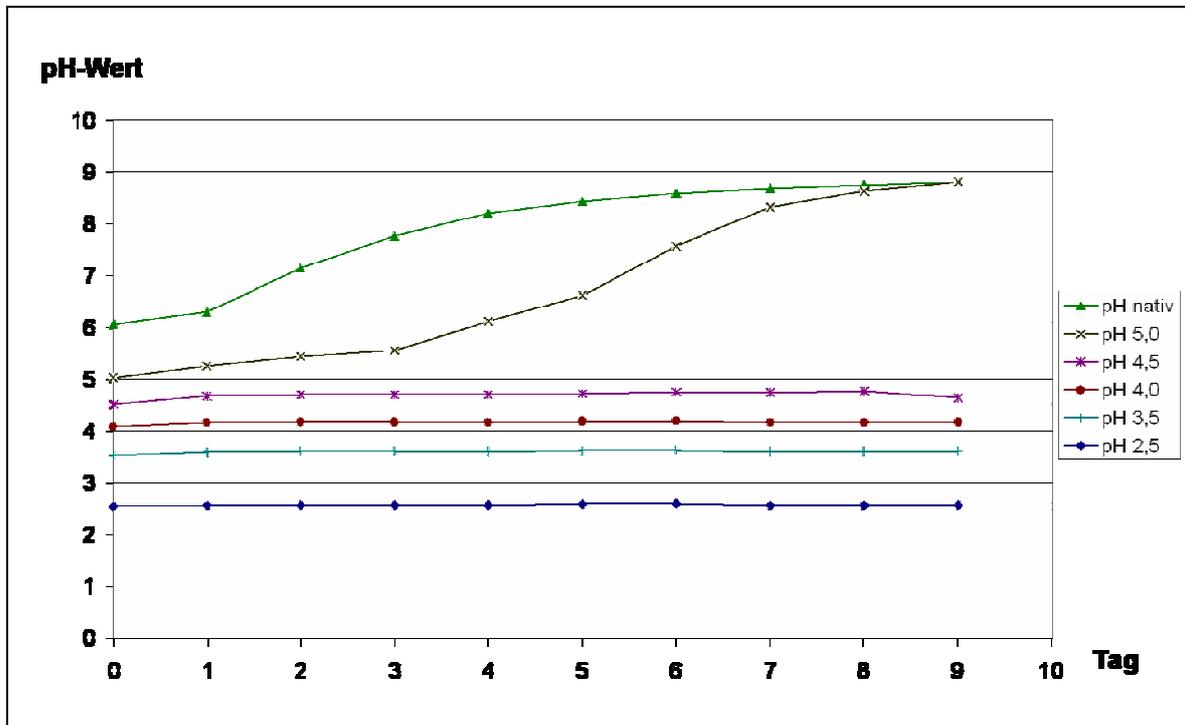


Abbildung 31: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin-Pool

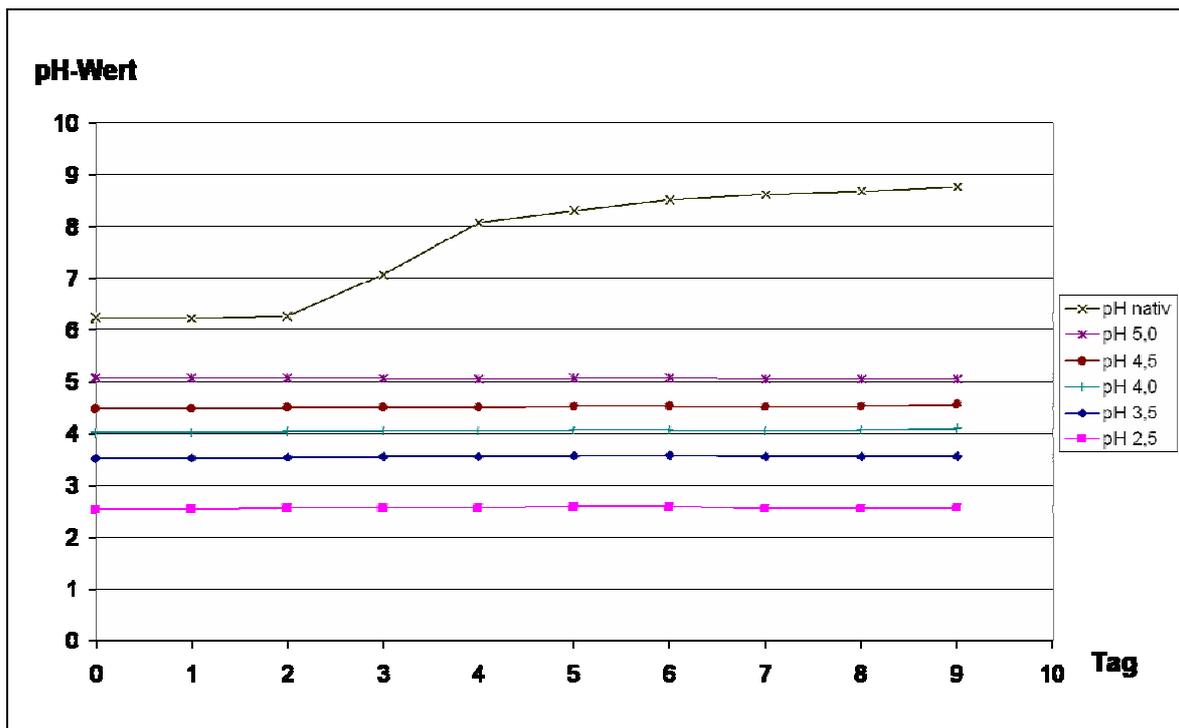


Abbildung 32: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 1

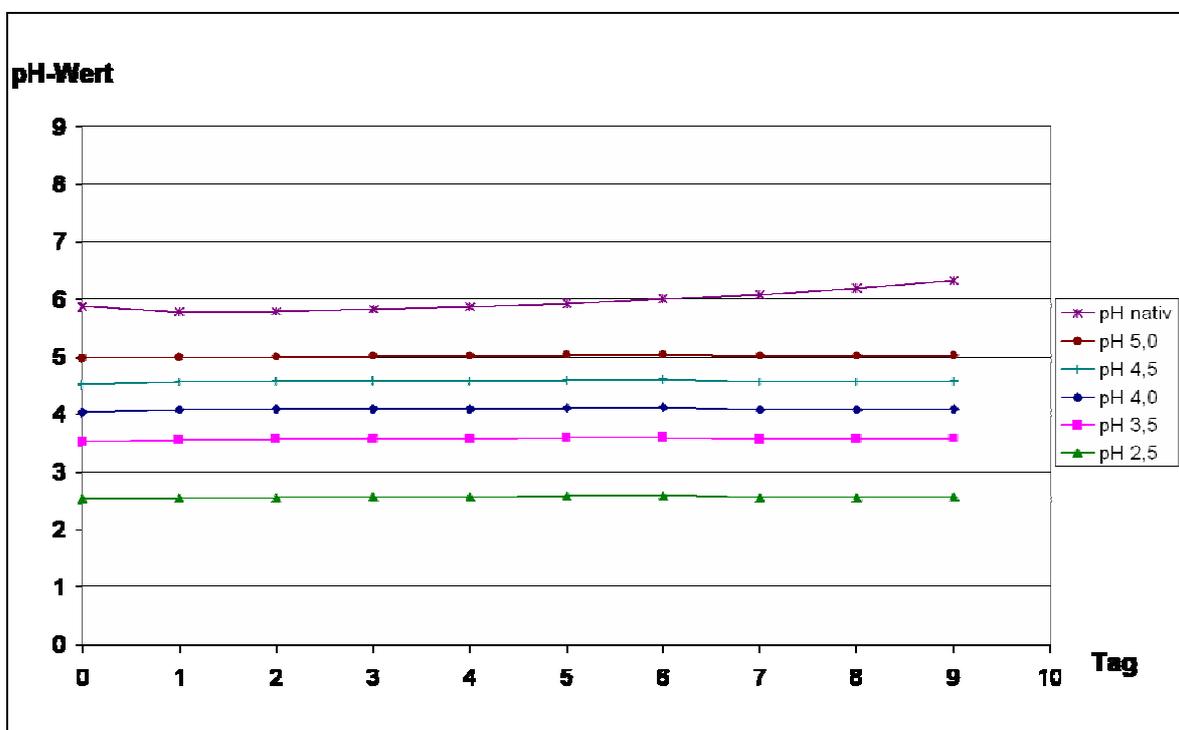


Abbildung 33: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 2

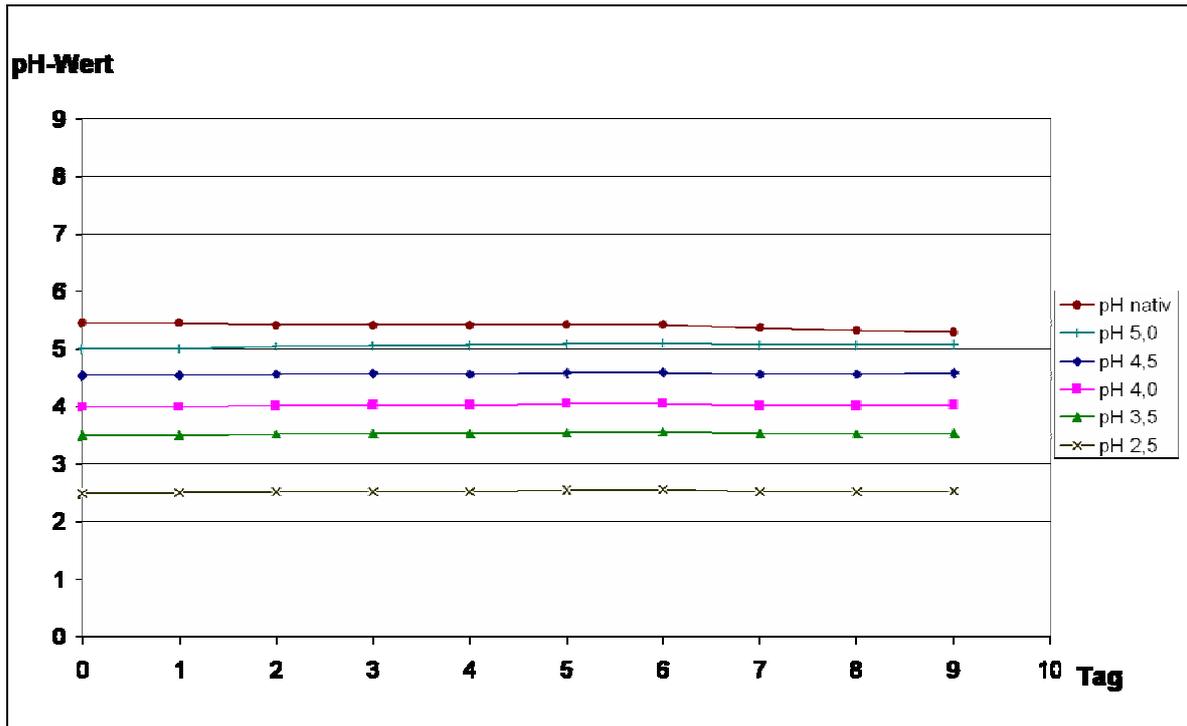


Abbildung 34: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 3

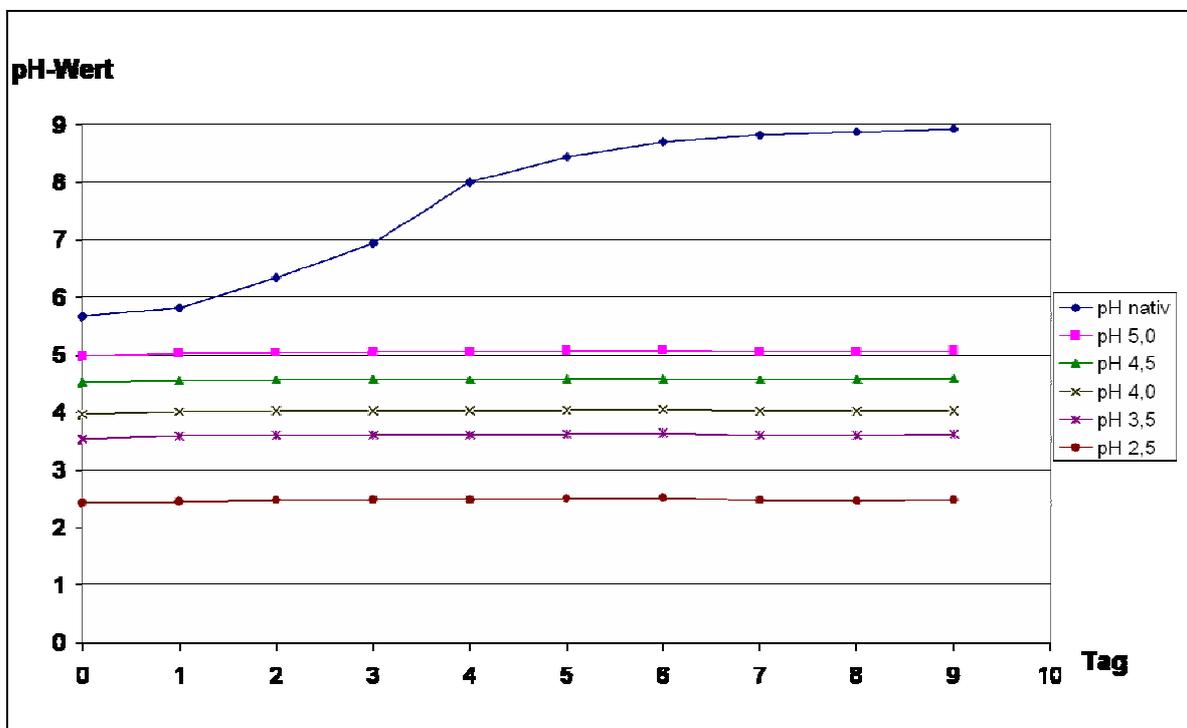


Abbildung 35: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 4

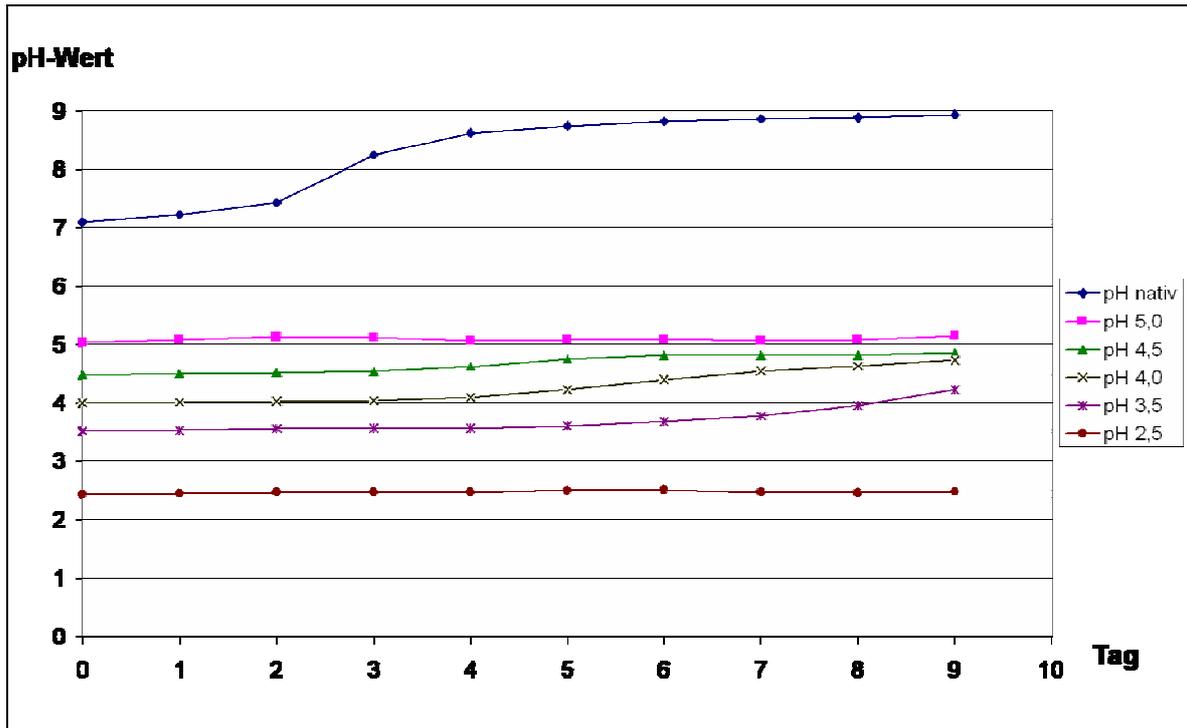


Abbildung 36: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 5

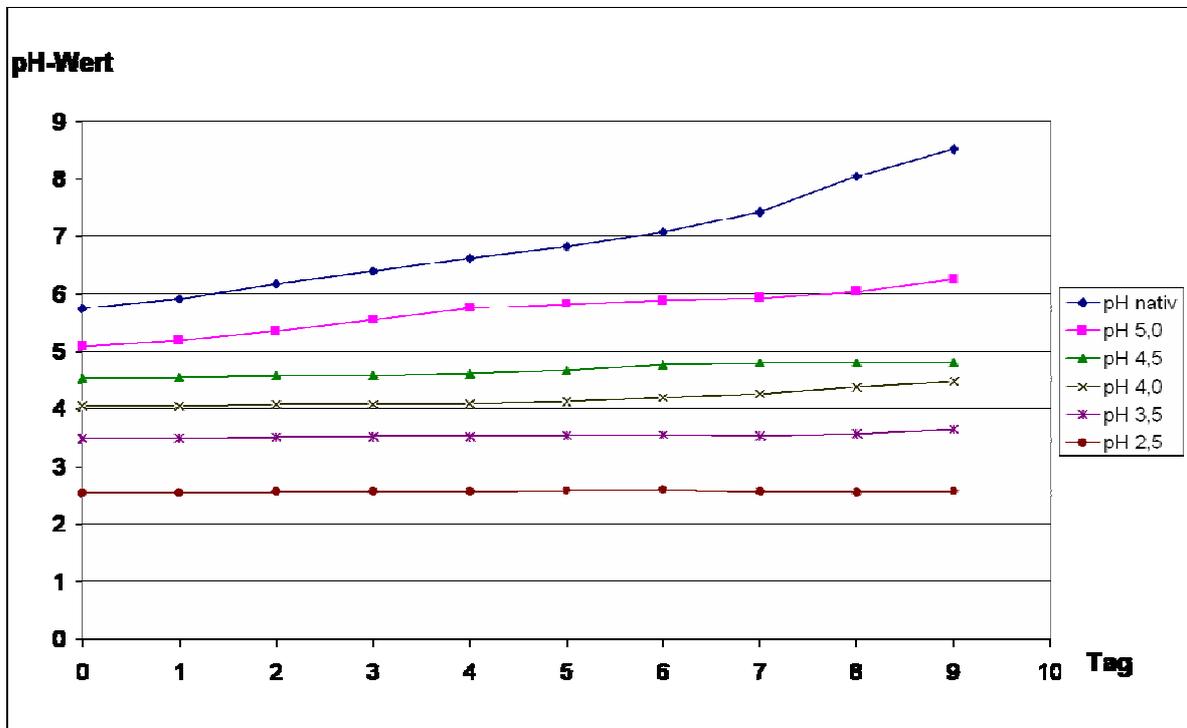


Abbildung 37: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 6

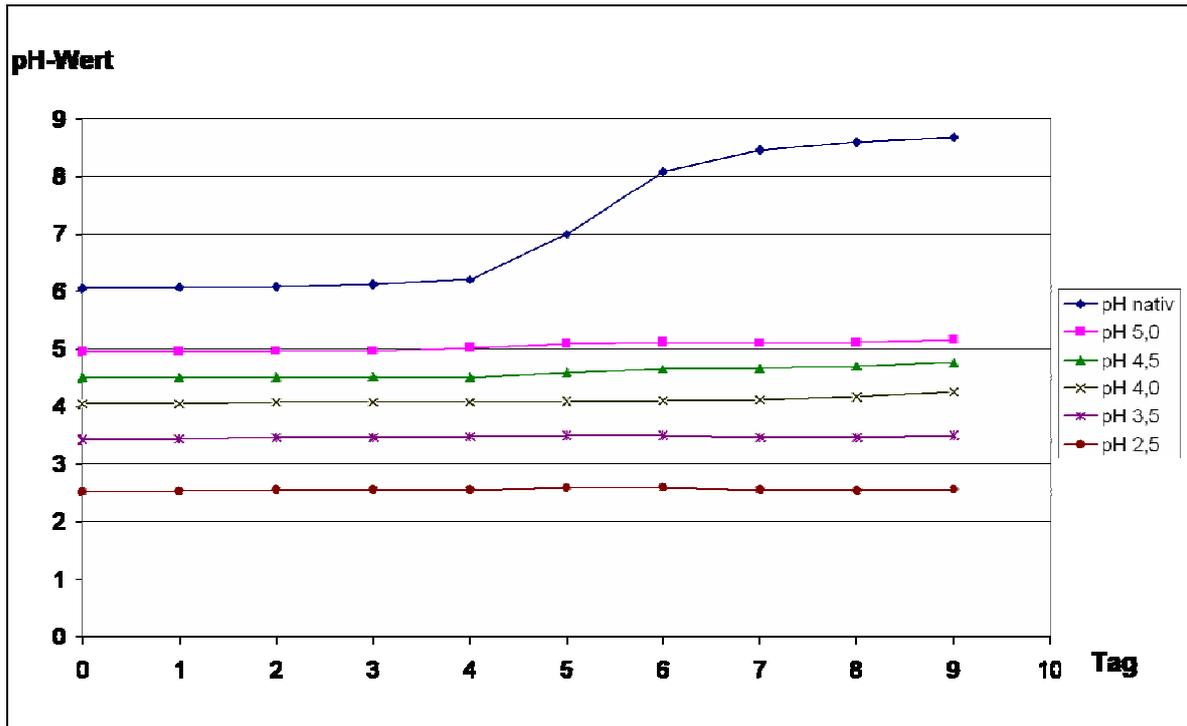


Abbildung 38: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 7

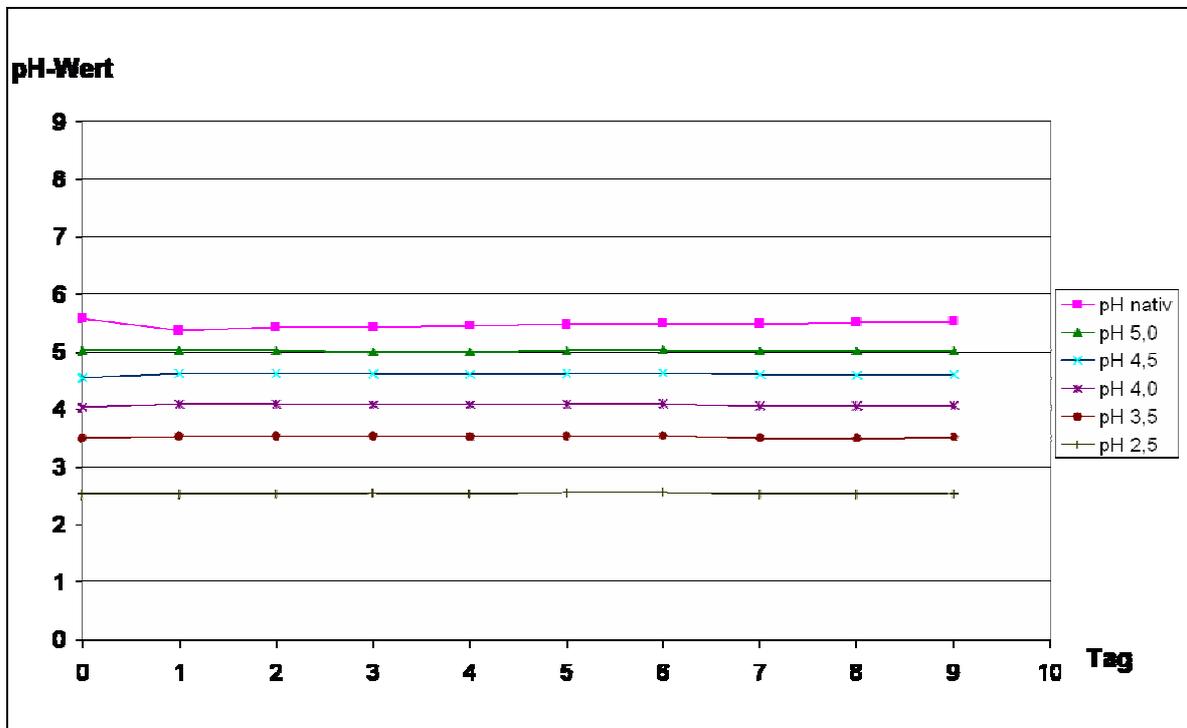


Abbildung 39: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 8

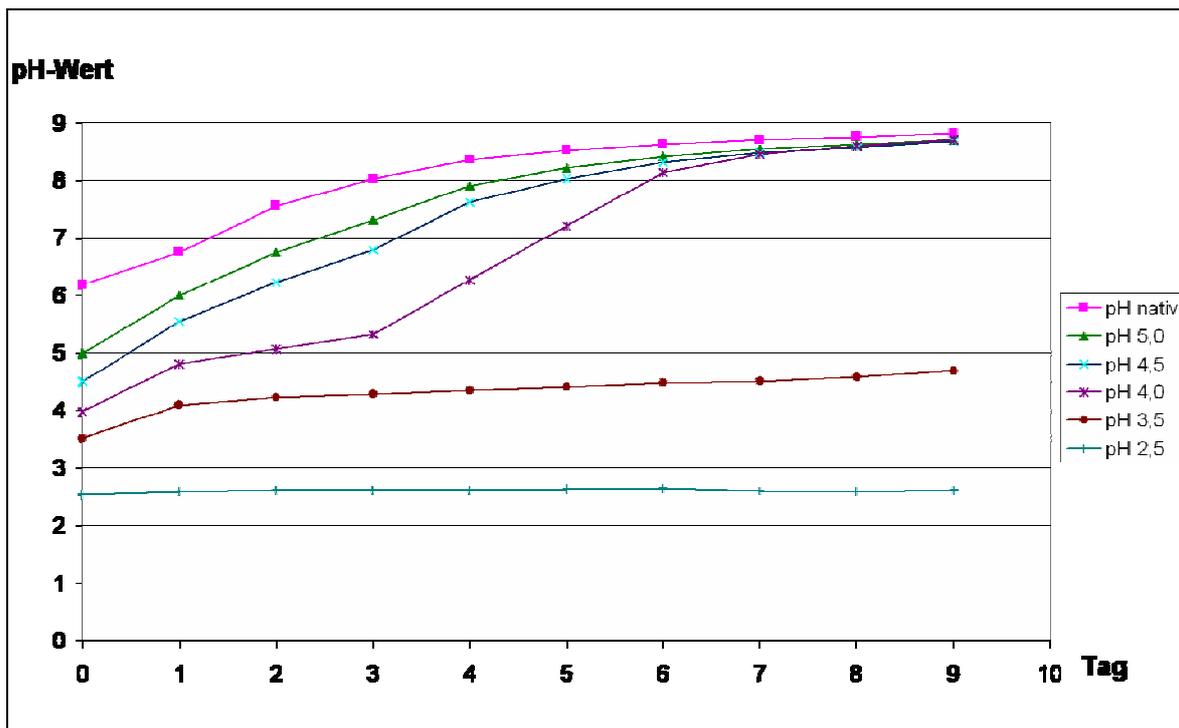


Abbildung 40: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 9

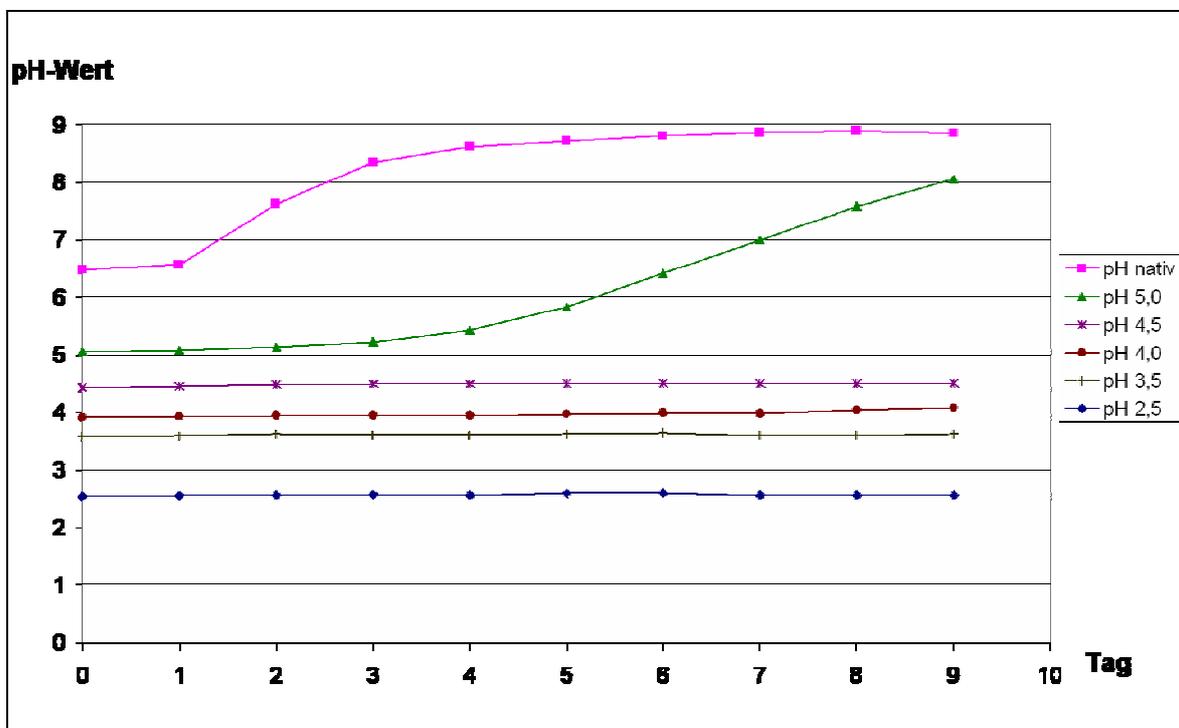


Abbildung 41: Zeitabhängige pH-Veränderung: 24h-Sammelurin Nr. 10

An den jeweiligen Urinproben ist zu erkennen, dass der pH-Wert von 3 Urinen, welche auf pH 5 eingestellt wurden, nicht über 10 Tage stabil ist, sondern ins alkalische driftet. Insgesamt ist am Urinpool zu erkennen, dass der eingestellte pH-Bereich von 2,5-4,5 über 10 Tage stabil bleibt.

6.1.1.2 Wiederfindung der Katecholamine in Abhängigkeit von der Zeit und pH

Um diese Frage zu beantworten, wurde der 24h-Sammelurin-Pool mit den Katecholaminen aufgestockt. Ein Aliquot des nicht aufgestockten 24h-Sammelurin-Pools und ein Aliquot des aufgestockten 24h-Sammelurin-Pools wurde jeweils 3-mal off-line aufgearbeitet und mittels HPLC und elektrochemischer Detektion sofort analysiert. Die ermittelten Durchschnittswerte sind in Tabelle 18 wiedergegeben. Der Durchschnittswert von Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin des aufgestockten 24h-Sammelurin-Pools wurde als 100% Wert festgelegt.

Tabelle 18: Durchschnittswerte der Konzentration der untersuchten Katecholamine im einem nativen und in einem aufgestockten 24h-Sammelurin-Pool

Analyt	native Urinprobe	aufgestockte Urinprobe
Noradrenalin	24,26 µg/L	95,9 µg/L
Adrenalin	7,44 µg/L	47,5 µg/L
Dopamin	85,74 µg/L	230,4 µg/L

Der tiefgefrorene 24h-Sammelurin-Pool wurde nach dem Auftauen aliquotiert. Die Aliquots wurden auf pH 4,5 bis 8 eingestellt. Eine entsprechende Probe wurde jeweils sofort, nach 24 Stunden (Tag 1), nach 48 Stunden (Tag 2) und nach 72 Stunden (Tag 4) aufgearbeitet und mittels HPLC und elektrochemischer Detektion

analysiert. Die Stabilität bzw. die Wiederfindung der Katecholamine bei Raumtemperatur in Abhängigkeit vom eingestellten pH-Wert (physiologischer pH-Bereich) und der Zeit sind in den Abbildungen 42 bis 44 für den jeweiligen Analyten dargestellt. Aus den Abbildungen ist ersichtlich, dass die Katecholamine in einem nativen 24h-Sammelurin-Pool nicht über 4 Tage stabil sind. Für die Sammlung des 24h-Sammelurins bis zur Analyse im Labor werden aber mindestens 3 Tage benötigt. Der 1. Tag wird für die Sammlung benötigt, der 2. Tag für den Transport des Sammelgefäßes zum Arzt bzw. zum Labor und am 3. Tag werden die Proben frühestens analysiert. Oftmals werden die Urinproben gesammelt, d.h. gelagert und später batchweise abgearbeitet.

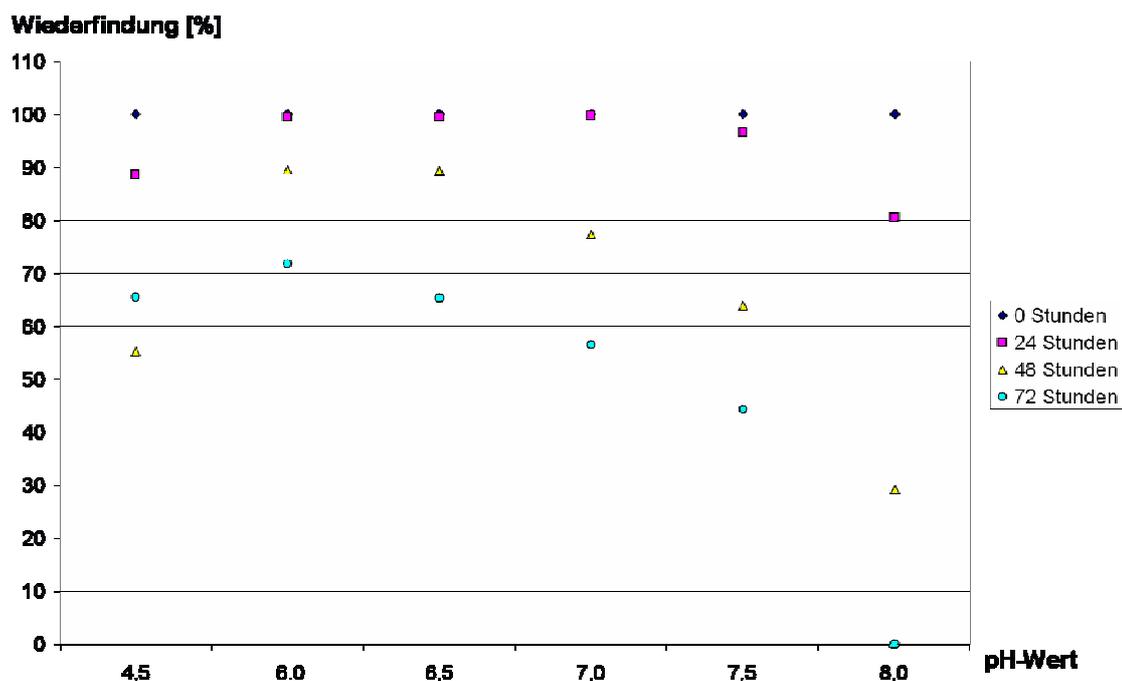


Abbildung 42: Wiederfindung [%] von Dopamin bei 21 °C in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Zeit

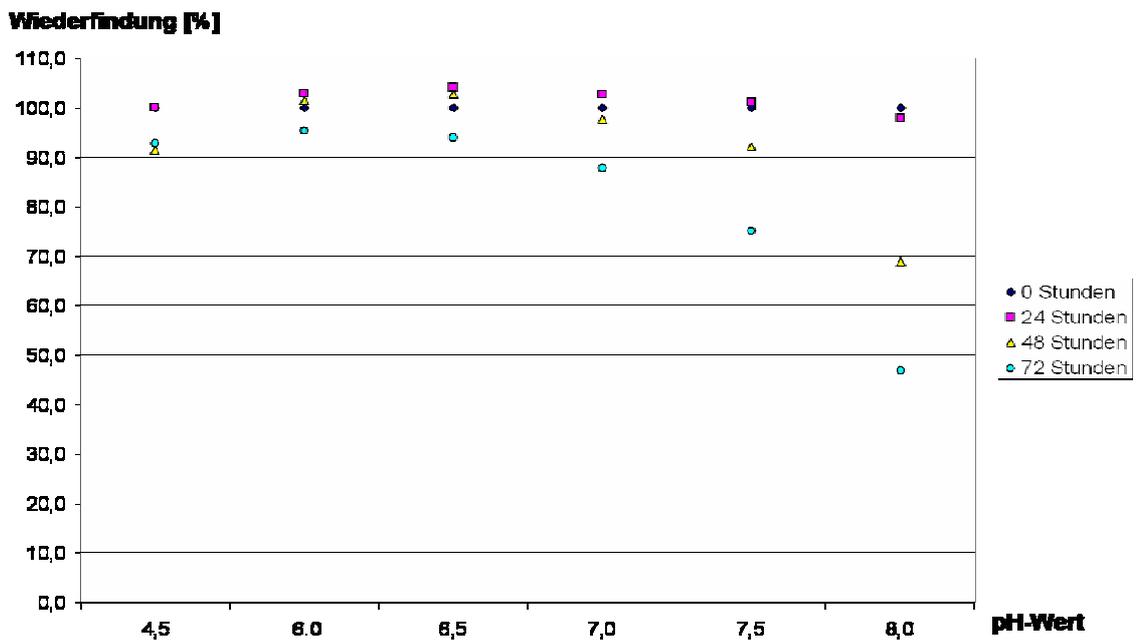


Abbildung 43: Wiederfindung [%] von Adrenalin bei 21 °C in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Zeit

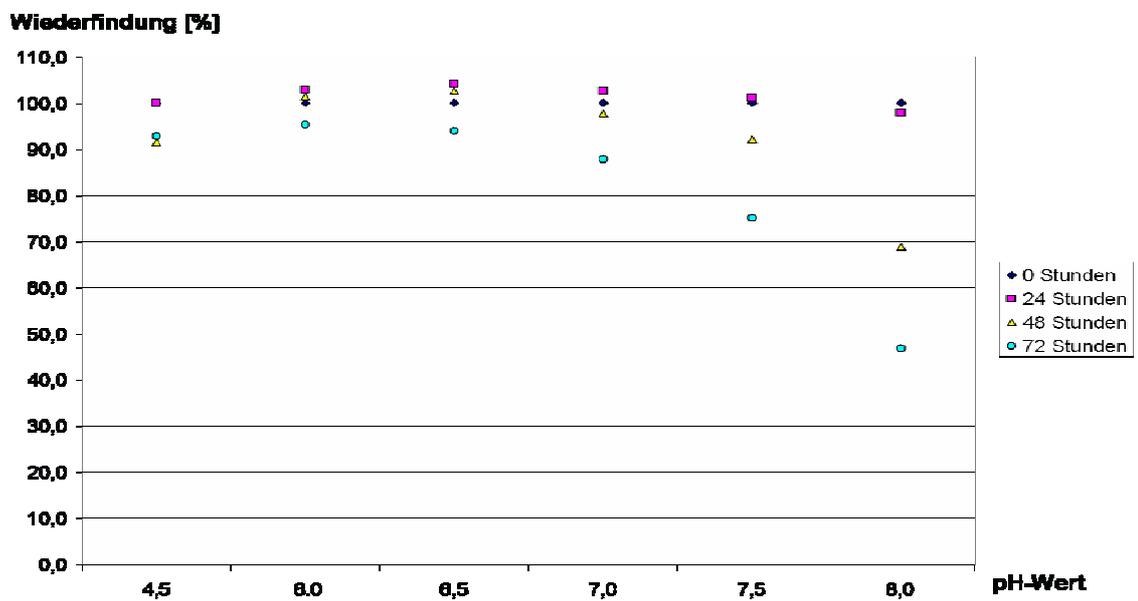


Abbildung 44: Wiederfindung [%] von Noradrenalin bei 21 °C in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Zeit

Diese Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Katecholamine in nativen 24h-Sammelurinen nicht stabil sind. Dieser Umstand ist primär auf die Erhöhung des pH-Wertes des 24h-Sammelurins nach einem bestimmten Zeitraum und der damit verbundenen leichten Oxidierbarkeit der Katecholamine zurückzuführen (siehe Abbildung 45).

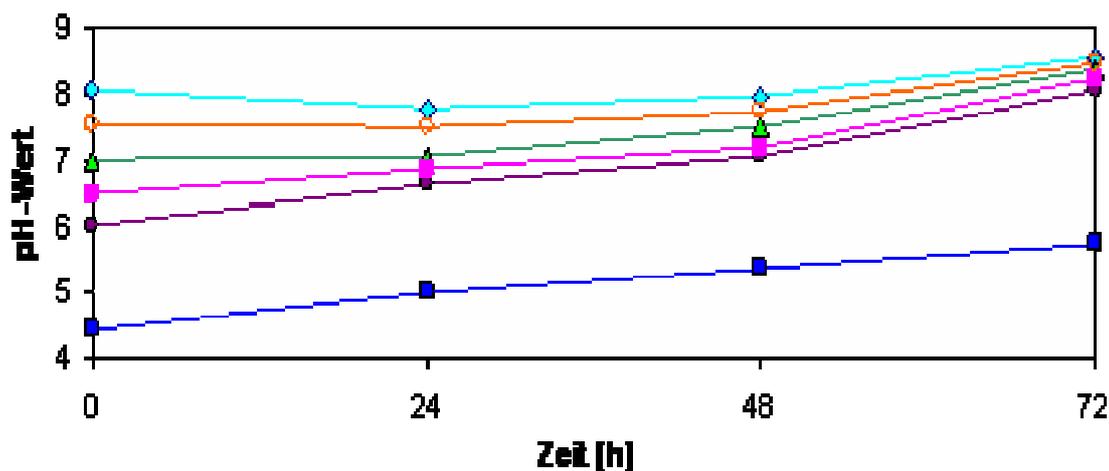


Abbildung 45: Zeitabhängiger Verlauf des pH-Wertes in gepoolten, nativen 24h-Sammelurinen bei 21°C

Da die Katecholamine auch lichtempfindlich sind, wurde der Versuch unter Lichtausschluss wiederholt. Neben den Katecholaminen wurden auch die anderen untersuchten Markermoleküle quantifiziert.

Poolurine wurden mit den Analyten dotiert und entsprechende Aliquots auf verschiedene pH-Werte eingestellt (in 13 Stufen von 0,5 pH-Einheiten von pH=0,5 bis pH=6,5). Die Bestimmung der Wiederfindung erfolgte über einen Zeitraum von 7 Tagen. Als optimal gelten Werte, die sich innerhalb der Grenzen der methodischen Messgenauigkeit befinden. In den folgenden Diagrammen ist dieser Messgenauigkeitsbereich grau hinterlegt (Abbildung 46). Zur besseren Übersicht sind statt der jeweils dreizehn gemessenen pH-Abstufungen nur vier wiedergegeben.

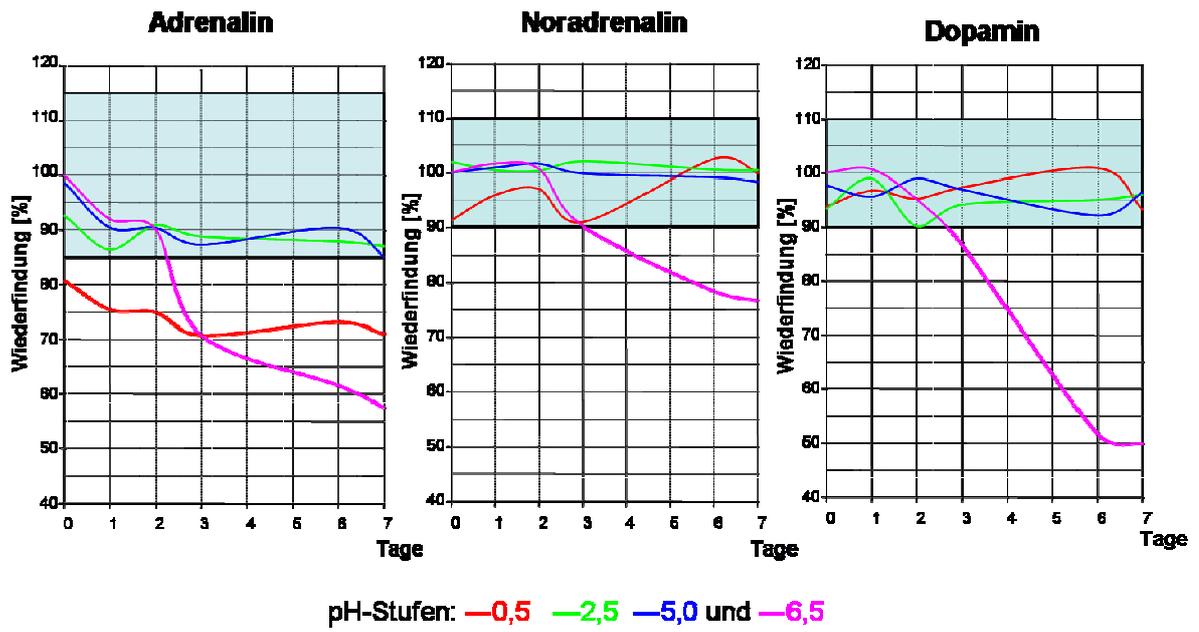


Abbildung 46: Wiederfindung der Katecholamine [%] über 7 Tage. Die Bereiche der Messgenauigkeit für Adrenalin ($\pm 15\%$), Noradrenalin ($\pm 10\%$) und Dopamin ($\pm 10\%$) sind grau unterlegt.

6.1.1.3 Wiederfindung der übrigen Markermoleküle

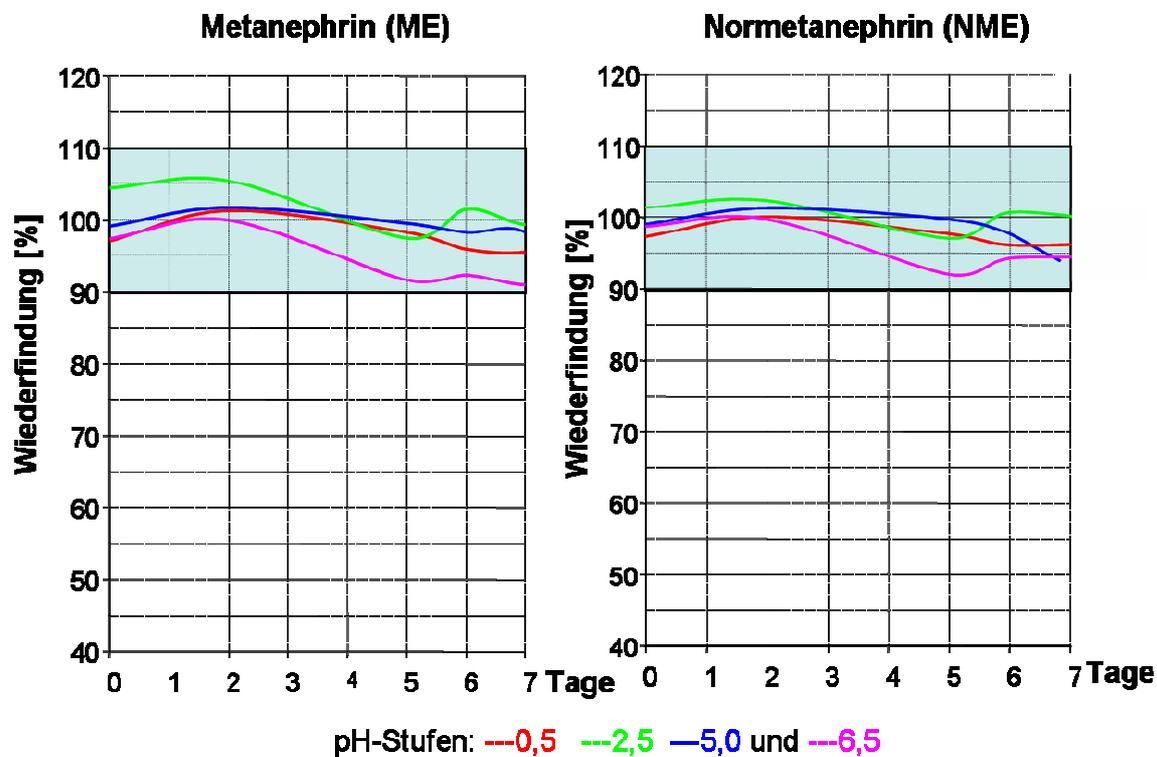


Abbildung 47: Wiederfindung [%] der Metanephrine über 7 Tage

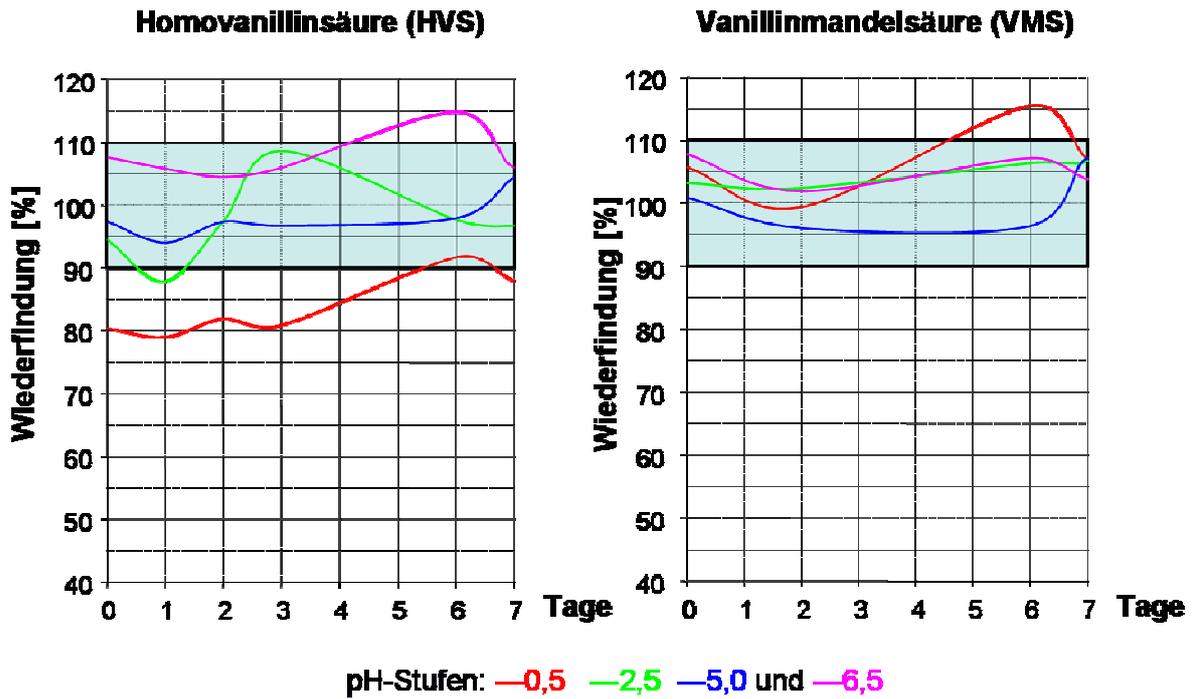


Abbildung 48: Wiederfindung [%] der Vanillinmandelsäure und der Homovanillinsäure über 7 Tage

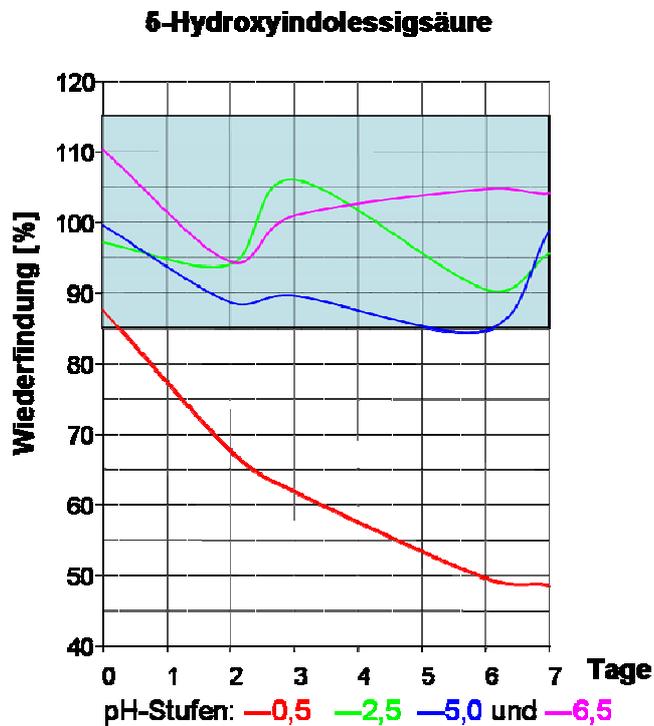


Abbildung 49: Wiederfindung [%] der 5-Hydroxyindolessigsäure über 7 Tage

Wie aus den Abbildungen 46 bis 49 hervorgeht, sind alle aufgeführten diagnostischen Parameter in einem 24h-Sammelurin bei Aufbewahrung im Dunkeln und Raumtemperatur in dem pH-Bereich von 2,5 bis 5,0 über 7 Tage stabil.

6.1.1.4 Ansäuerung des 24h-Urins

Um eine Langzeitstabilisierung der untersuchten Markermoleküle im 24h-Sammelurin zu erreichen, muss wie zuvor bewiesen, der 24h-Sammelurin angesäuert werden. Bislang wurden für die Ansäuerung von 24h-Sammelurinen ausschließlich flüssige Säuren wie Salzsäure, Schwefelsäure, Essigsäure u. a. beschrieben (siehe Kapitel 0, 2.2.3, 2.3.3 und 2.4.3). Der Umgang mit diesen Säuren ist jedoch für den Patienten und das Pflegepersonal nicht ungefährlich. Die Verätzungsgefahr (z.B. durch rauchende Salzsäure) und der beißende Geruch (Eisessig) fördern nicht die Compliance des Patienten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher nach einer Lösung gesucht werden, die die Verätzungsgefahr herabsetzt und die Compliance des Patienten erhöht.

6.1.2 Partikuläre, säurebindende Adsorbermaterialien

Wie im Folgenden beschrieben, wurde untersucht, ob die zur Stabilisierung notwendige Säure an ein partikuläres, poröses Adsorbermaterial „gebunden“ werden kann. Durch die „Physisorption“ der flüssigen Säure an ein poröses Trägermaterial sollte die Verätzungsgefahr für den Patienten bzw. das Pflegepersonal bei der 24h-Urinsammlung minimiert werden.

6.1.2.1 Anforderungen

Folgende Anforderungen werden an ein entsprechend geeignetes Trägermaterial gestellt:

- es muss in Gegenwart von konzentrierter Säure eine hohe Quellfähigkeit (poröses Kapillarnetzwerk) besitzen
- das Trägermaterial sollte eine Langzeitstabilität unter stark sauren pH-Bedingungen
- sowie bei Raumtemperatur aufweisen
- das Trägermaterial sollte keine Verbindungen generieren oder Verunreinigungen freisetzen, welche zu Interferenzen bei dem nachfolgenden HPLC-Analyseverfahren führen und somit die Quantifizierung der Analyten stören
- die Zielanalyte sollten nicht irreversibel an das Trägermaterial adsorbieren und somit zu einer geringen Wiederfindung führen

C Poly-(acrylsäure-co-acrylsäureamid) Kaliumsalz; Partikeldurchmesser: 200-1000 μm ; (Firma Sigma-Aldrich). Das Granulat trägt das Gefahrensymbol Xi (reizend) und hat einen pH-Wert von 5,5-6,0. In Abbildung 51 ist die Strukturformel dargestellt.

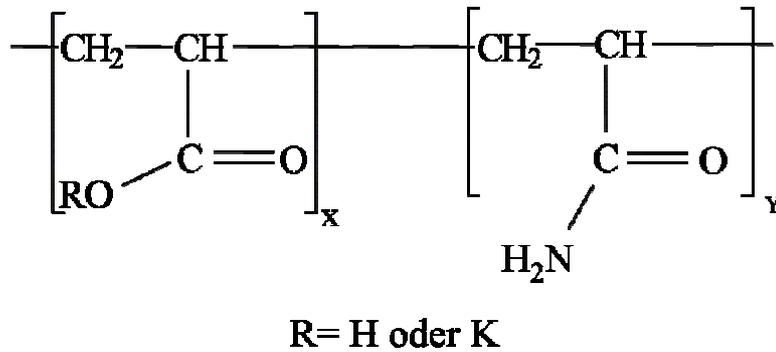


Abbildung 51: Poly-(acrylsäure-co-acrylsäureamid) Kaliumsalz

Zunächst wurde die Aufnahmekapazität der Hydrogele A, B und C ermittelt. Es wurden 2 mL einer 28,75 %igen Salzsäure (HCl) vorgelegt. Dies entspricht einer Molmenge von 18 mmol. Danach wurde das jeweilige Adsorbiermaterial in 100 mg Portionen zugefügt und die Suspension kurz gemischt. Bestimmt wurde die Menge an Adsorbiermaterial, bei der die vorgelegte Salzsäure visuell vollständig adsorbiert wurde. Folgende Werte wurden ermittelt:

- Hydrogel A : 700 mg
- Hydrogel B : 700 mg
- Hydrogel C : 600 mg

6.1.2.3 Adsorptionsverhalten

Zunächst wurden die Adsorbentmaterialien auf ihre Fähigkeit untersucht, die Säure bei unterschiedlichen Temperaturen über einen längeren Zeitraum hinweg zu „physisorbieren“.

Hierzu wurden pro Einwaage 2,0 mL einer 28,75 %igen Salzsäurelösung (18 mmol) in einem Probenröhrchen mit dichtem Schraubdeckel vorgelegt. Nach Zugabe des Adsorbens wurde sofort gemischt um eine homogene Verteilung zu gewährleisten. Die Proben wurden nach einer Stunde Nachquellzeit in einen vorgeheizten Trockenschrank (37,5 °C) bzw. in einen Kühschrank gestellt. Ein weiterer Ansatz wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Das Adsorptionsverhalten der untersuchten Hydrogele wurde dadurch bestimmt, in welchem Ausmaß freie, d.h. flüssige Säure in den entsprechenden Proben vorlag bzw. auftrat. Gegebenenfalls wurde die Menge an Adsorbent erhöht um die vorgelegte Säure vollständig zu adsorbieren.

In den Abbildungen 52 bis 54 ist die benötigte Mindestmenge an Adsorbent in Abhängigkeit von der Lagerzeit und Temperatur als Diagramm dargestellt. Bei Verwendung von Hydrogel A verändert sich das Adsorptionsvermögen gegenüber flüssiger Salzsäure nur geringfügig bei 37 °C und Lagerung bei 21 °C über 92 Tage. Bei 4 °C dagegen muss die Menge an Adsorbent nahezu verdoppelt werden um die vorgelegte Säure adsorptiv zu binden. Der Grund hierfür liegt darin, dass Hydrogel A bei Lagerung im Kühschrank schrumpft und somit weniger Säure über Physisorption aufnehmen kann. Das Hydrogel C hingegen ist bei 4 °C über 92 Tage am stabilsten (Abbildung 54). Dies trifft nicht bei einer Lagerung bei 37 °C und Raumtemperatur zu. Unter diesen Bedingungen ist das Hydrogel C das Adsorbent mit dem schlechtesten Adsorptionsverhalten.

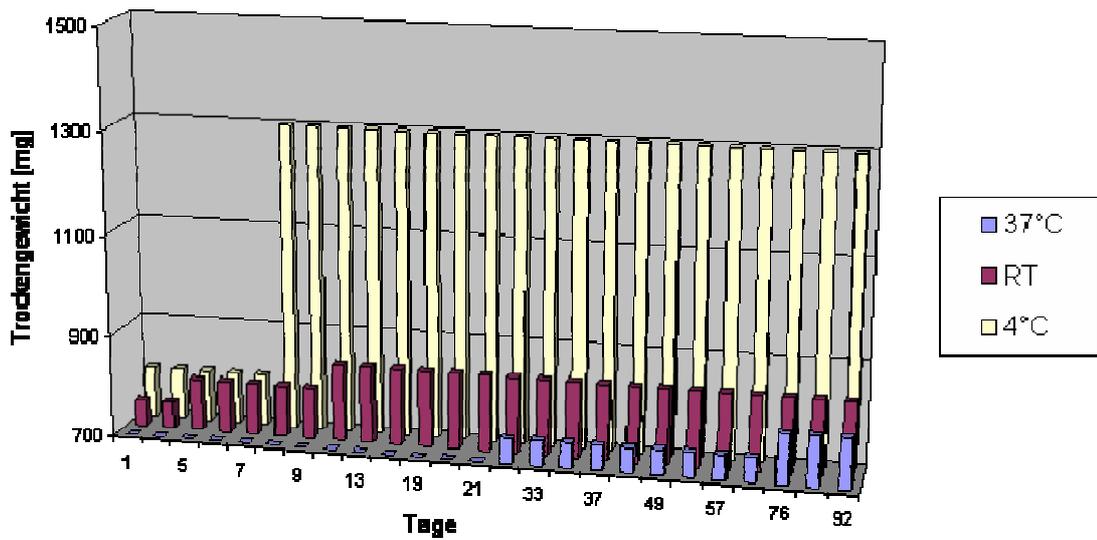


Abbildung 52: Benötigte Mindestmenge an Hydrogel **A** in Abhängigkeit von der Lagerzeit und Temperatur. Vorgelegte Säure: 2,0 mL HCl 28,75% ($\hat{=}$ 18 mmol)

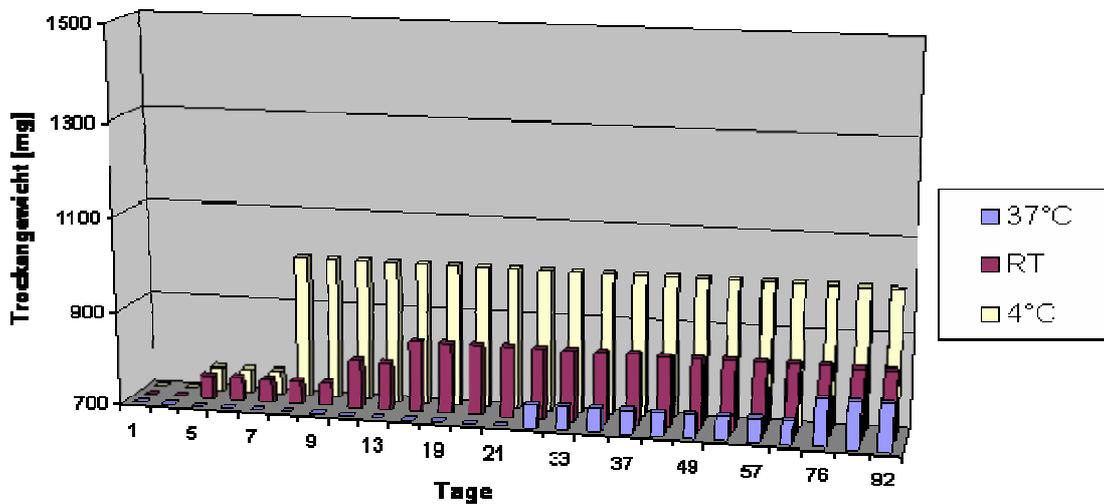


Abbildung 53: Benötigte Mindestmenge an Hydrogel **B** in Abhängigkeit von der Lagerzeit und Temperatur. Vorgelegte Säure: 2,0 mL HCl 28,75% ($\hat{=}$ 18 mmol)

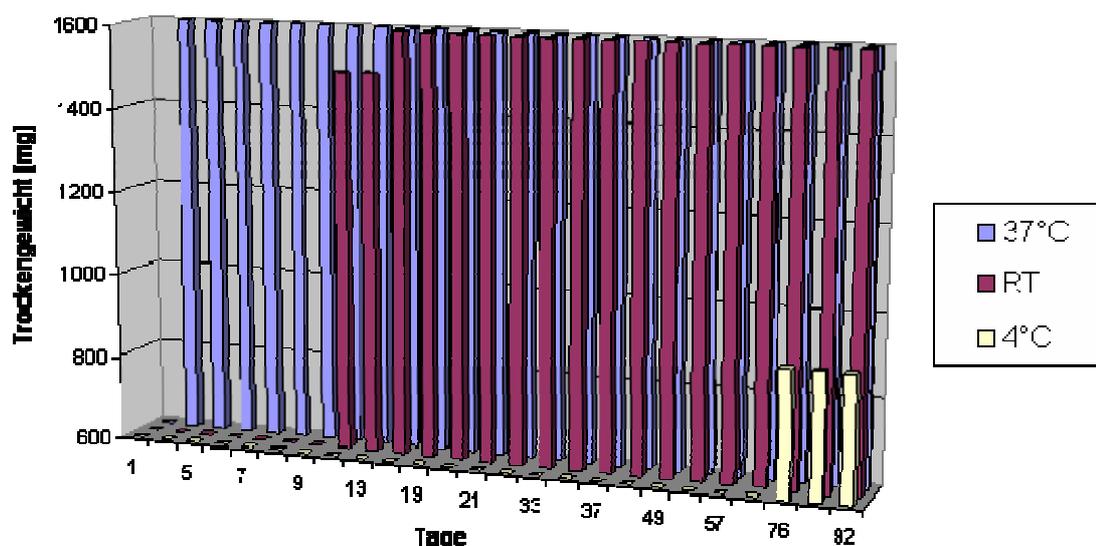


Abbildung 54: Benötigte Mindestmenge an Hydrogel C in Abhängigkeit von der Lagerzeit und Temperatur. Vorgelegte Säure: 2,0 mL HCl 28,75% (\approx 18 mmol)

Das Hydrogel B zeigt das beste Adsorptionsverhalten über den gesamten untersuchten Temperaturbereich und Zeitraum (Abbildung 53). Da das Hydrogel B auch preiswerter als Hydrogel A und C ist, wurden die weiteren Untersuchungen nur mit Hydrogel B durchgeführt.

6.1.2.4 Überprüfung auf potentielle Interferenzen

In den nachstehend beschriebenen Versuchen sollte untersucht werden, inwieweit das säure-haltige Hydrogel B Verbindungen generiert bzw. Verunreinigungen freisetzt, welche zu Interferenzen bei den nachfolgenden HPLC-Analyseverfahren führen und somit die Quantifizierung der untersuchten Analyten stören. Zudem wurde die Wiederfindung der Analyten bestimmt, um irreversible Wechselwirkungen mit dem Adsorbentmaterial auszuschließen.

6.1.2.4.1 Vergleichende off-line Probenaufbereitung mit anschließender HPLC-ECD Analyse von Katecholaminen in Urin

Für die Herstellung des Salzsäure-haltigen Hydrogels B wurden 1 g Copolymer (Trockengewicht) mit 1,19 mL 32 %ige HCl (12 mmol) versetzt und gemischt. 200 mL eines 24h-Sammelurins wurden mit 1,5 g Salzsäure-haltigem (18 mmol) Hydrogel versetzt. Die auf pH 2.0 angesäuerte Urinprobe wurde mit: Noradrenalin (NA, 100 µg/L), Adrenalin (A, 50 µg/L) und Dopamin (DA, 200 µg/L) dotiert. Für den Vergleich der Chromatogramme wurden 200 mL desselben 24h-Sammelurin mit 1,79 mL 32 %ige HCl (18 mmol) versetzt. Aliquots der beiden Proben wurden off-line aufgearbeitet und quantifiziert.

Die Messung wurde im Labor der Firma Recipe Chemicals + Instruments GmbH in München unter Verwendung des ClinRep[®]Kit durchgeführt. Ein Aliquot der 24h-Sammelurinprobe wurde über eine off-line Festphasenextraktion an einem Kationenaustauscher aufgearbeitet. Die analytische Trennung der Katecholamine Noradrenalin (NA), Adrenalin (A), Dopamin (DA) und des internen Standards Dihydroxybenzylamin (DHBA) erfolgte über eine C-18 Umkehrphasensäule (150 mm x 3,9 mm ID) bei einer Flussrate von 1,0 mL/min und 30 °C. Die Detektion erfolgte elektrochemisch mit einem amperometrischen Detektor. Das Arbeitspotential wurde auf 500 mV und der Arbeitsbereich auf ±10 nA eingestellt.

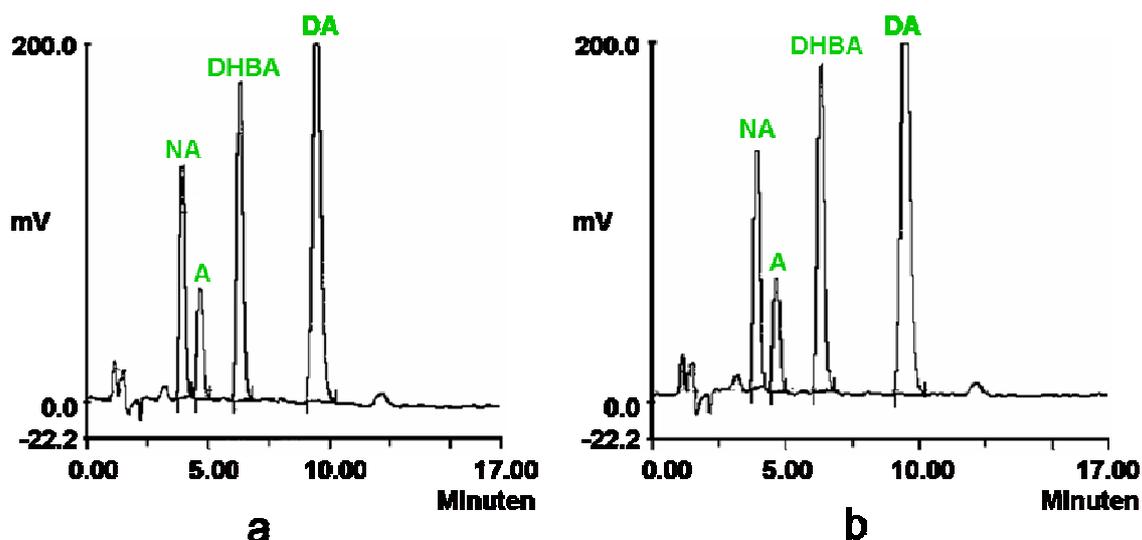


Abbildung 55: Chromatogramme einer mit den untersuchten Katecholaminen aufgestockten Probe eines 24h-Sammelurins a. Ansäuerung mit flüssiger Salzsäure (18 mmol) b. Ansäuerung mit Salzsäurehaltigem (18 mmol) Hydrogel B

Das Chromatogramm b in Abbildung 55 zeigt, dass keine Interferenzen bzw. zusätzliche Peaks bei der mit Hydrogel B versetzten Urinprobe auftreten. Somit ist eine Quantifizierung dieser harngängigen Markermoleküle möglich. Auch stimmen die Peakhöhen überein, was auf eine vergleichbare Wiederfindung schließen lässt (siehe auch Abbildung 60).

Für die anschließende Überprüfung auf störende Interferenzen des Hydrogel B bei der Quantifizierung der übrigen untersuchten Markermoleküle wurde ein 24h-Sammelurin mit Metanephrin (ME), Normetanephrin (NME), Vanillinmandelsäure (VMS), Homovanillinsäure (HVS), 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIES), Serotonin (SER) und Hydroxyprolin (HYP) dotiert. 200 mL des dotierten 24h-Sammelurins wurden mit 1,5 g Salzsäurehaltigem (18 mmol) Hydrogel B versetzt (pH 2,0). Die 200 mL Vergleichsprobe wurde mit 1,79 mL 32 %iger HCl (18 mmol) versetzt. Beide Proben wurden off-line aufgearbeitet und quantifiziert.

6.1.2.4.2 Vergleichende off-line Probenaufbereitung mit anschließender HPLC-ECD Analyse von Metanephrinen in Urin

Die Messung wurde im Labor der Firma Recipe Chemicals + Instruments GmbH in München unter Verwendung des ClinRep®Kit durchgeführt. Ein Aliquot der 24h-Sammelurinprobe wurde über eine off-line Festphasenextraktion an einem Kationenaustauscher aufgearbeitet. Die analytische Trennung der Metanephriene Normetanephrin (NME), Metanephrin (ME) und des internen Standards Hydroxymethylbenzylamin (HMBA) erfolgte über eine C-18 Umkehrphasensäule (150 mm x 3,9 mm ID) bei einer Flussrate von 1,0 mL/min und 30 °C. Die Detektion erfolgte elektrochemisch mit einem amperometrischen Detektor. Das Arbeitspotential wurde auf 720 mV und der Arbeitsbereich auf ± 10 nA eingestellt.

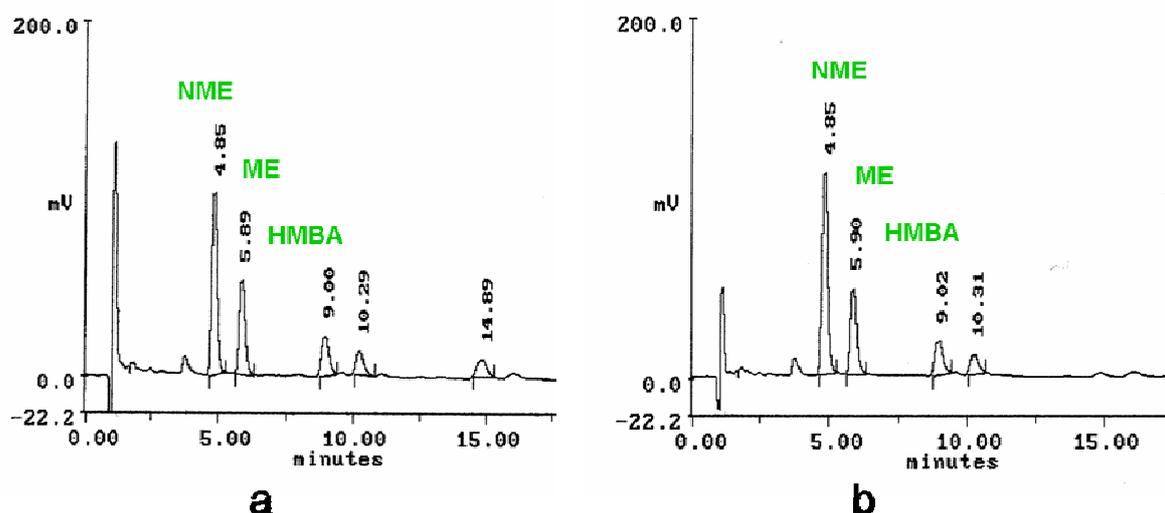


Abbildung 56: Chromatogramme einer mit Normetanephrin, Metanephrin und internem Standard dotierten Probe eines 24h-Sammelurins a. Ansäuerung mit flüssiger Salzsäure (18 mmol) b. Ansäuerung mit Salzsäure-haltigem (18 mmol) Hydrogel B

Das Chromatogramm b in Abbildung 56 zeigt, dass keine Interferenzen bzw. zusätzliche Peaks bei der mit Hydrogel B versetzten Urinprobe auftreten. Somit ist eine Quantifizierung dieser harngängigen Markermoleküle möglich. Auch stimmen die Peakhöhen überein, was auf eine vergleichbare Wiederfindung schließen lässt (siehe auch Abbildung 61).

6.1.2.4.3 Vergleichende off-line Probenaufbereitung mit anschließender HPLC-ECD Analyse von Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure und 5-Hydroxyindolessigsäure in Urin

Die Messung wurde im Labor der Firma Recipe Chemicals + Instruments GmbH in München unter Verwendung des ClinRep[®]Kit durchgeführt. Ein Aliquot der 24h-Sammelurinprobe wurde über eine off-line Festphasenextraktion an einem Anionenaustauscher aufgearbeitet. Die analytische Trennung der VMS, HVS, 5-HIES und des internen Standards iso-VMS erfolgte über eine C-8 Umkehrphasensäule (125 mm x 3,0 mm ID) bei einer Flussrate von 0,9 mL/min und 30 °C. Die Detektion erfolgte elektrochemisch mit einem amperometrischen Detektor. Das Arbeitspotential wurde auf 800 mV und der Arbeitsbereich auf ±50 nA eingestellt.

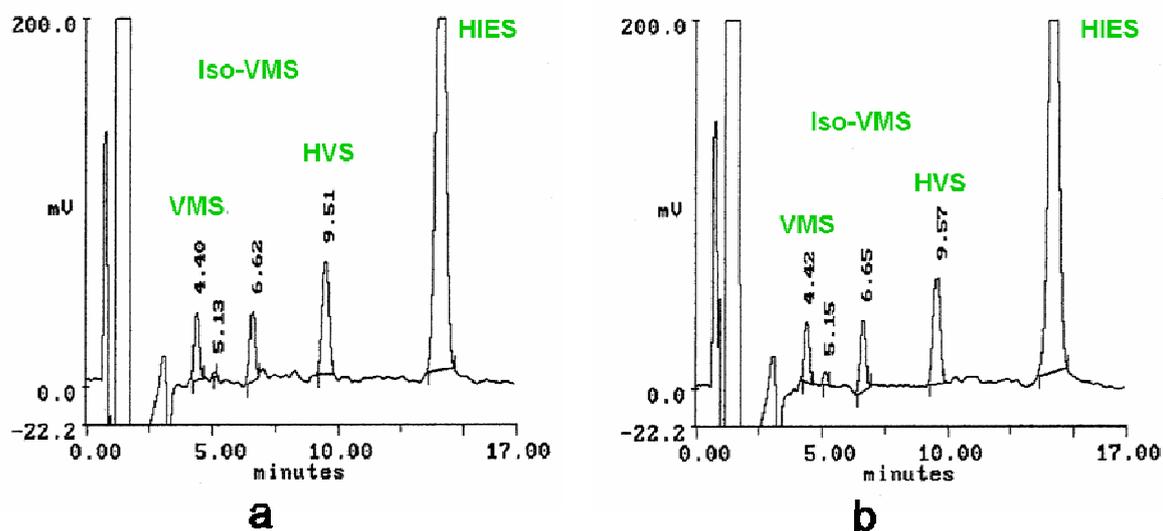


Abbildung 57: Chromatogramme einer mit Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure, 5-Hydroxyindolessigsäure und internem Standard dotierten Probe eines 24h-Sammelurins a. Ansäuerung mit flüssiger Salzsäure (18 mmol) b. Ansäuerung mit Salzsäure-haltigem (18 mmol) Hydrogel B

Das Chromatogramm b in Abbildung 57 zeigt, dass keine Interferenzen bzw. zusätzliche Peaks bei der mit Hydrogel B versetzten Urinprobe auftreten. Somit ist eine Quantifizierung dieser harngängigen Markermoleküle möglich. Auch stimmen die Peakhöhen überein, was auf eine vergleichbare Wiederfindung schließen lässt (siehe auch Abbildung 61).

6.1.2.4.4 Vergleichende off-line Probenaufbereitung mit anschließender HPLC-ECD Analyse des Serotonins in Urin

Die Messung wurde im Labor der Firma Recipe Chemicals + Instruments GmbH in

München unter Verwendung des ClinRep[®]Kit durchgeführt. Ein Aliquot der 24h-Sammelurinprobe wurde über eine off-line Festphasenextraktion an einem Kationenaustauscher aufgearbeitet. Die analytische Trennung des Serotonins (SER) und des internen Standards N-Methylserotonin (MSER) erfolgte über eine C-18 Umkehrphasensäule (150 mm x 3,6 mm ID) bei einer Flussrate von 1,0 mL/min und 30 °C. Die Detektion erfolgte elektrochemisch mit einem amperometrischen Detektor. Das Arbeitspotential wurde auf 450 mV und der Arbeitsbereich auf ±10 nA eingestellt.

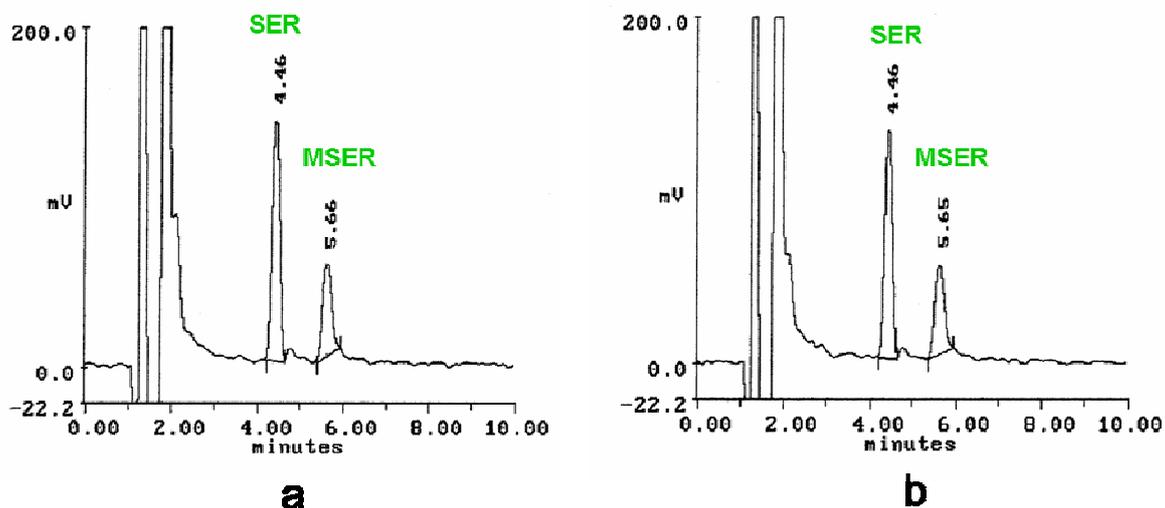


Abbildung 58: Chromatogramme einer mit Serotonin und internem Standard dotierten Probe eines 24h-Sammelurins a. Ansäuerung mit flüssiger Salzsäure (18 mmol) b. Ansäuerung mit Salzsäurehaltigem (18 mmol) Hydrogel B

Das Chromatogramm b in Abbildung 58 zeigt, dass keine Interferenzen bzw. zusätzliche Peaks bei der mit Hydrogel B versetzten Urinprobe auftreten. Somit ist eine Quantifizierung des Serotonins möglich. Auch stimmen die Peakhöhen überein, was auf eine vergleichbare Wiederfindung schließen lässt (siehe auch Abbildung 61).

6.1.2.4.5 Vergleichende off-line Probenaufbereitung mit anschließender HPLC-UV Analyse des Hydroxyprolins in Urin

Die Messung wurde im Labor der Firma Recipe Chemicals + Instruments GmbH in München unter Verwendung des ClinRep®Kit durchgeführt. Die analytische Trennung des Hydroxyprolins (HYP) und des internen Standards erfolgte über eine C-8 Umkehrphasensäule (125 mm x 3,0 mm ID) bei einem Stufengradient und 60°C. Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 471 nm.

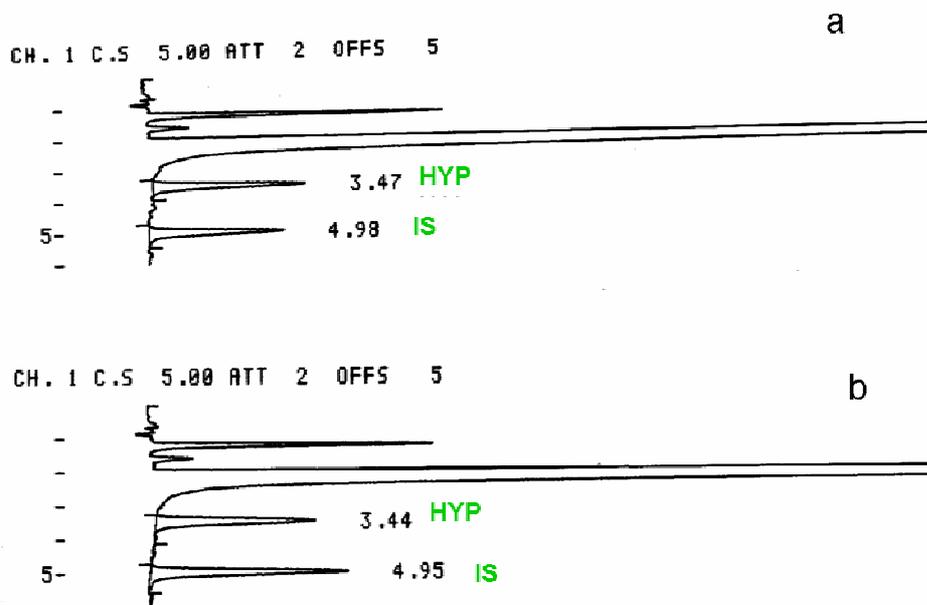


Abbildung 59: Chromatogramme einer mit Hydroxyprolin und internem Standard dotierten Probe eines 24h-Sammelurins a. Ansäuerung mit flüssiger Salzsäure (18 mmol) b. Ansäuerung mit Salzsäurehaltigen (18 mmol) Hydrogel B

Das Chromatogramm b in Abbildung 59 zeigt, dass keine Interferenzen bzw. zusätzliche Peaks bei der mit Hydrogel B versetzten Urinprobe auftreten. Somit ist eine Quantifizierung des Hydroxyprolins möglich.

6.1.2.5 Überprüfung der Wiederfindung bei Verwendung des Hydrogel B

Ein 24h-Sammelurin wurde über Hydrogel B (15 g Trockengewicht), welches mit 180 mmol Salzsäure versetzt war, gesammelt. Der pH-Wert betrug 2,2. 2,0 L dieses 24h-Sammelurins wurden mit NA, A, DA, VMS, HVS, HIES, NME, ME, SER und mit HYP dotiert. Die Dotierung erfolgte direkt über die Einwaage der entsprechenden Substanzmengen oder über die Zugabe einer Stammlösung in 0,1 molarer HCl. Ein weiteres Aliquot wurde als Leerwert 3-fach aufgearbeitet und vermessen. Die Markermoleküle wurden über eine Ein-Punkt Kalibrierung quantifiziert und die ermittelte Analytkonzentration dem Sollwert aufaddiert. Jede zu vermessende Serie enthielt matrixbehaftete Qualitätskontrollen im nativen und pathogenen Bereich. Der korrigierte Sollwert wurde als 100 % festgelegt. Die Katecholamine wurden am Tag der Dotierung nach 24 Stunden, 48 Stunden und 120 Stunden manuell aufgearbeitet und quantifiziert (vgl. Kapitel 6.1.2.4). Die entsprechenden Urinproben wurden 3-fach aufgearbeitet und chromatographiert.

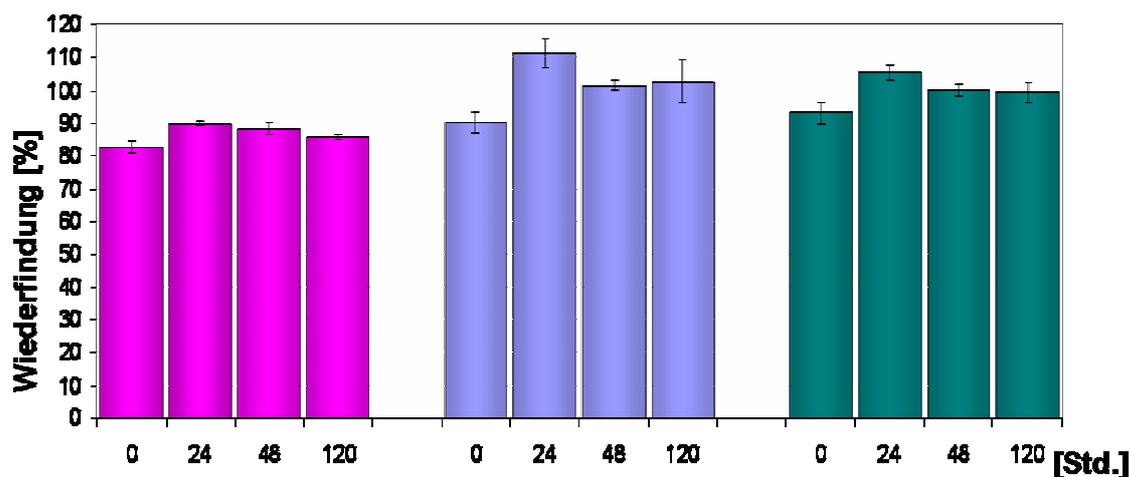


Abbildung 60: Stabilität und Wiederfindung (n=3) der Katecholamine bei Raumtemperatur in einem dotierten 24h-Sammelurin bei Verwendung des Salzsäure-haltigen Hydrogel B (pH=2,2)

Der über Salzsäure-haltigem Hydrogel B gewonnene 24h-Sammelurin kann ohne einen signifikanten oxidativen Abbau der Katecholamine Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin mindestens 5 Tage bei Raumtemperatur gelagert werden. Das gleiche gilt für die restlichen – in dieser Arbeit untersuchten - harngängigen Markermoleküle (siehe Abbildung 61).

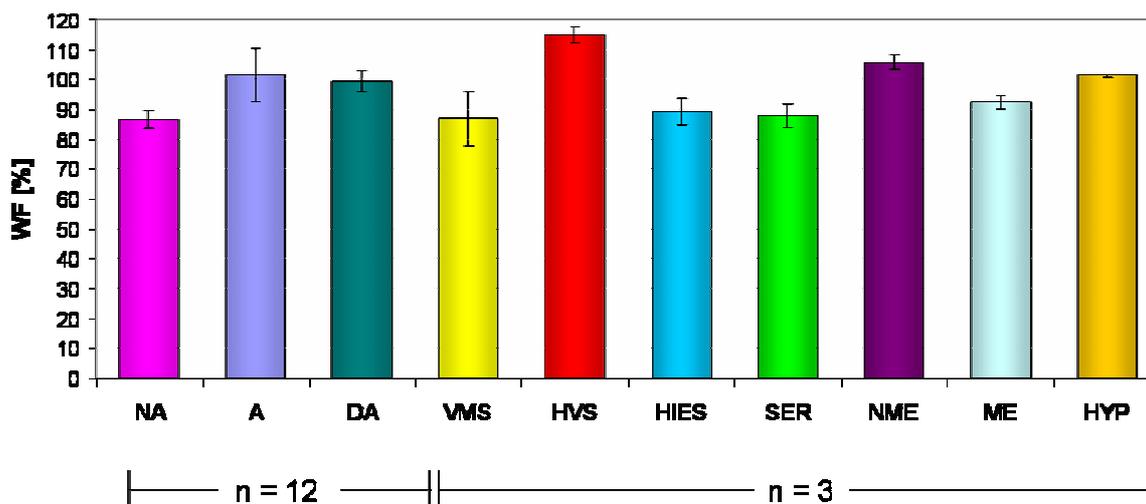


Abbildung 61: Wiederfindung (WF) leicht oxidierbarer, endogener Verbindungen in einer repräsentativen Probe eines 24h-Sammelurins (pH 2,2) bei Verwendung des Salzsäure-haltigen Hydrogels B

Das partikuläre, Salzsäure-haltige Hydrogel B stabilisiert die untersuchten Verbindungen bei Raumtemperatur (RT), führt zu keinen Interferenzen in der HPLC-Analytik, erlaubt die Lagerung des 24h-Sammelurins über einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen bei RT und erlaubt somit auch eine batchweise Abarbeitung der Proben. Für den Patienten und das Pflegepersonal wäre ein solcher „Stabilisator“ einfach und sicher zu handhaben, da keine flüssige Säure vorgelegt wird, sondern eine pastenartige, poröse Masse. Die geringen Standardabweichungen bezüglich der Wiederfindung der untersuchten Analyte garantieren darüber hinaus eine reproduzierbare quantitative Messung auch nach mindestens 5 Tagen.

6.1.2.6 Ermittlung der benötigten Molmenge an Salzsäure bei Verwendung von Hydrogel B

Um die Frage zu beantworten, welche Stoffmenge an partikulär gebundener Salzsäure benötigt wird, um in einem 24h-Sammelurin einen pH-Wert von 2 zu erhalten, wurde folgende Studie durchgeführt. 60 erwachsene Probanden wurden gebeten eine 24h-Urinsammlung über Hydrogel B, welches 230 mmol an Salzsäure enthielt, bei Raumtemperatur durchzuführen. Den Probanden wurden zwei 2 Liter Sammelgefäße ausgehändigt, welche das Salzsäure-haltige Hydrogel B enthielten (20 g Trockengewicht, vorgelegte Salzsäure 11,406 mL 32 %ig, entspricht 230 mmol). Zur Überprüfung der Urinsammlung wurde der Kreatinin-Wert bestimmt (Abbildung 62 und Abbildung 63), dessen Mittelwert 1,27 g/24h betrug. Zusätzlich wurde das Volumen des gesammelten Urins (siehe Abbildung 64) und dessen pH-Wert gemessen (siehe Abbildung 65).

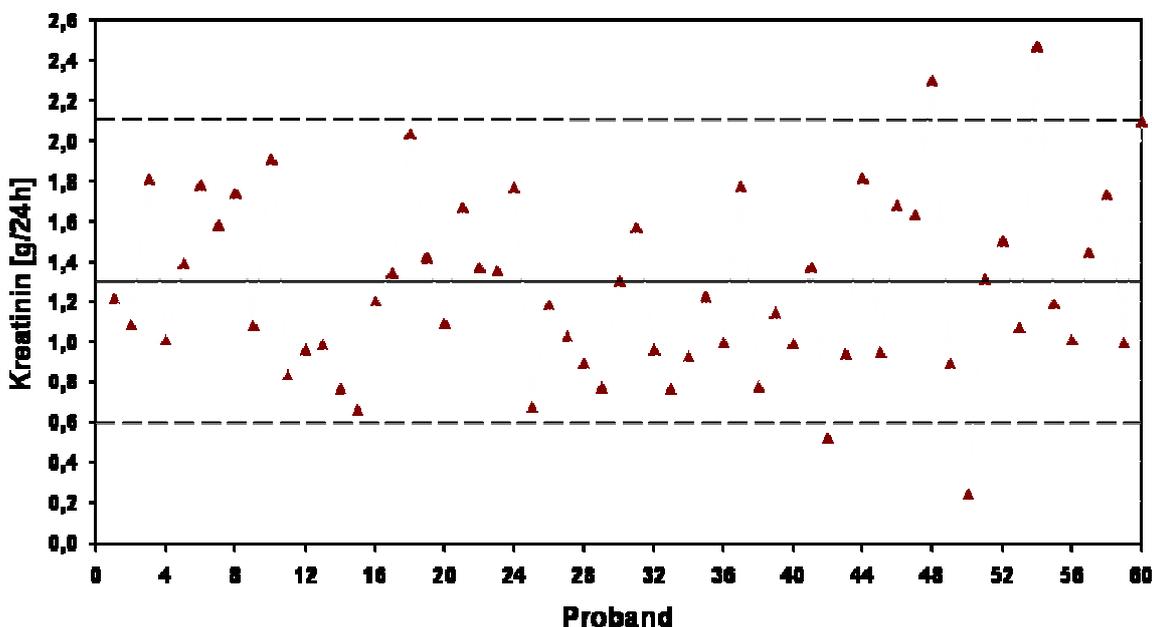


Abbildung 62: Verteilung der Kreatininwerte um den Richtwert (0,6 - 2,1 g / 24 h, gestrichelte Linie); durchgezogene Linie: Mittelwert

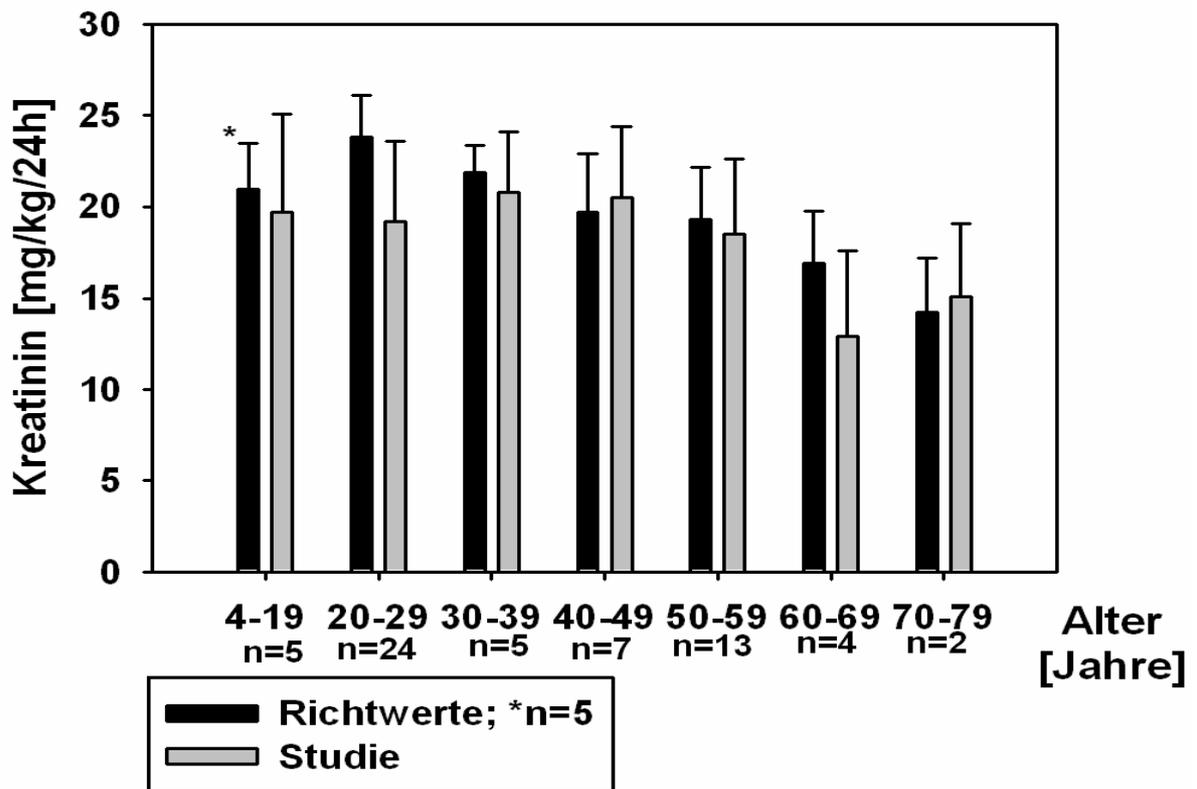


Abbildung 63: Überprüfung der Vollständigkeit der 24h- Urinsammlung (n=60) über die Kreatininausscheidung

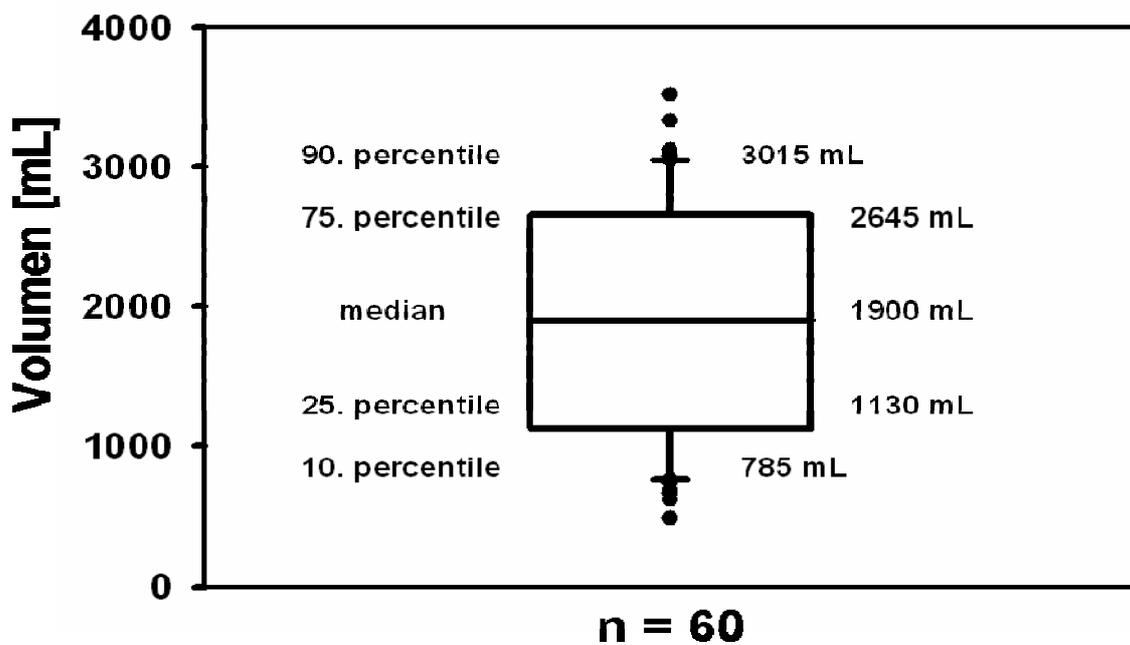


Abbildung 64: Volumenverteilung von 24h-Sammelurinen (n=60)

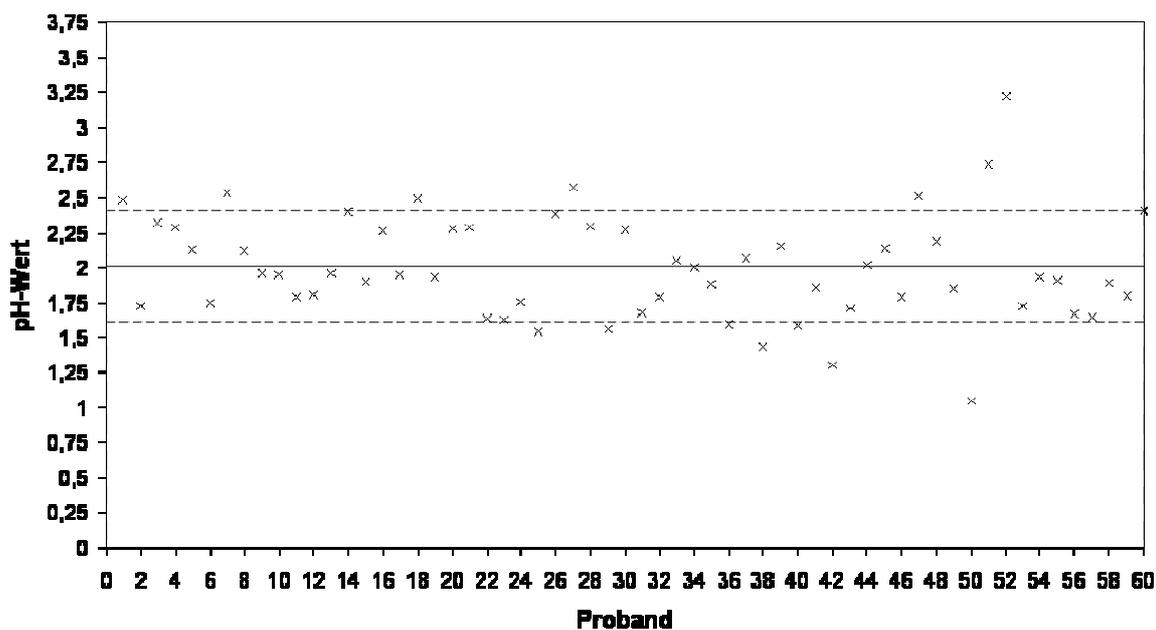


Abbildung 65: pH-Wert der 24h-Sammelurine bei Vorlage von Salzsäurehaltigem Hydrogel B versetzt mit 230 mmol bzw. 460 mmol HCl; durchgezogene Linie: Mittelwert, gestrichelte Linie: Standardabweichung

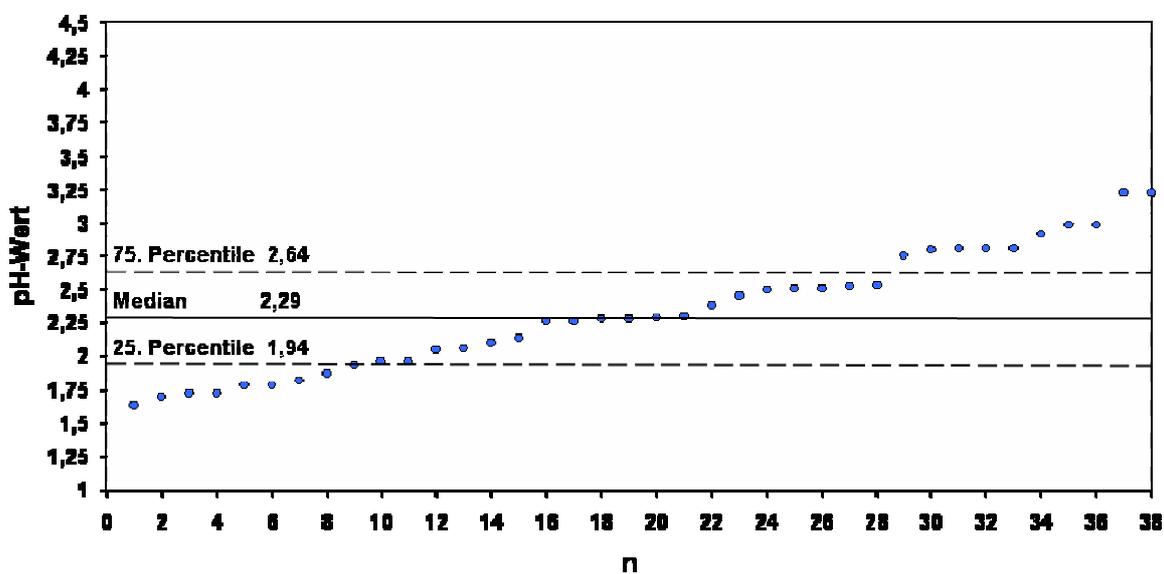


Abbildung 66: pH-Wert der 24h-Sammelurine (1800-2000 ml, n=38) nach Vorlage von Hydrogel B (230 mmol HCl); durchgezogene Linie: Median, gestrichelte Linie: 75. bzw. 25. Percentile

Zusammenfassend zeigte die Probanden-Studie, dass das vorgelegte und mit Salzsäure-versetzte Adsorbermaterial Hydrogel B alle untersuchten 24h-Sammelurine auf den erwünschten pH-Bereich einstellt (Abbildung 66).

6.1.3 Zusatz von Salzsäure

Der Spruch: „Erst das Wasser, dann die Säure, sonst passiert das Ungeheure!“ gilt auch für die Sammlung von 24h-Urin. Daher wurde in weiteren Untersuchungen überprüft, welche Konzentration bzw. Molmenge an Salzsäure notwendig ist.

6.1.3.1 pH-Wert Bereich

Um eine größtmögliche Stabilität der untersuchten Markermoleküle und damit auch eine hohe analytische Qualität zu gewährleisten sollte garantiert sein, dass der pH-Wert eines 24h-Sammelurins in einem Bereich zwischen 2-5 liegt. Bei niedrigeren oder höheren pH-Werten sind die untersuchten Markermoleküle - wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt - überwiegend nicht stabil (siehe Kapitel 6.1.1.2 und Kapitel 6.1.1.3). Wie ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurde (Kapitel 6.1.2.6) schwankt das Volumen von 24h-Sammelurinen zwischen 785 mL und 3015 mL (10. und 90. Percentile, n=60). Dies führt dazu, dass die Konzentration einer vorgelegten Säure stark variiert.

6.1.3.2 Konzentration der Salzsäure

In der Literatur (siehe Kapitel 2) werden unterschiedlich konzentrierte Salzsäurelösungen als Vorlage für die Gewinnung eines 24h-Sammelurins eingesetzt. Im Extremfall wird eine 36 %ige d.h. rauchende Salzsäurelösung verwendet. Um die Verätzungsgefahr zu minimieren und die Compliance der Patienten zu verbessern, sollte daher eine verdünnte Salzsäurelösung verwendet werden.

6.1.3.3 Molmenge der Salzsäure pro 24h-Sammelurin

Von jedem 24h-Sammelurin wurden dessen pH und Kreatinin-Wert sowie das Volumen bestimmt (Abbildungen 67, 68 und 70). Ein Volumenanteil von 5 % wurde den jeweiligen 24h-Sammelurinen entnommen und daraus ein 24h-Poolurin hergestellt. Von den 60 24h-Urien wurde jeweils ein Aliquot (100 mL) entnommen und mit 1 M HCl auf unterschiedliche pH-Werte titriert (Abbildung 71).

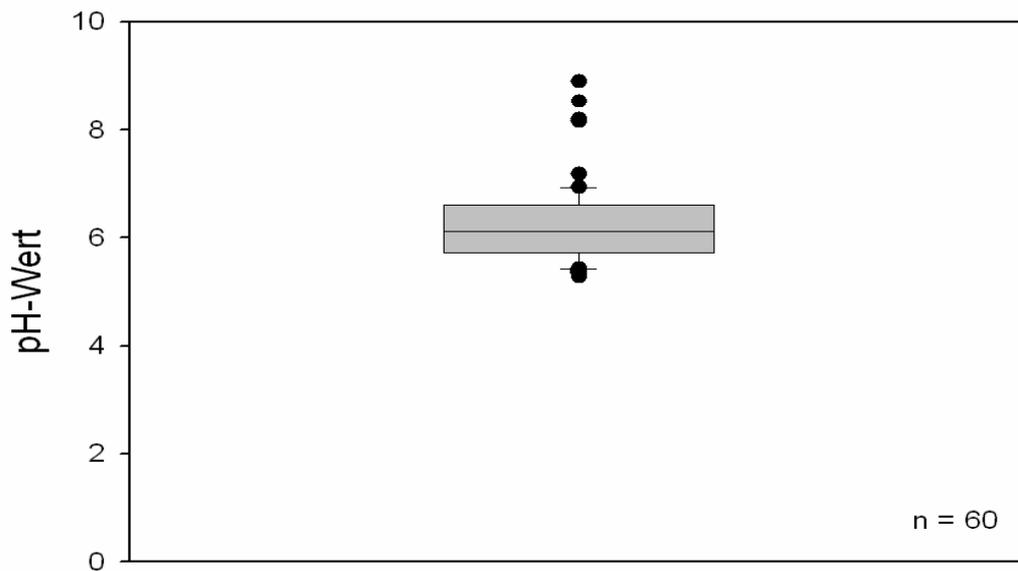


Abbildung 67: Native 24h-Sammelurine: Verteilung (Boxplot) des pH-Werts

Aus der Abbildung 67 geht hervor, dass der pH-Bereich von nativen 24h-Sammelurinen zwischen pH 5 und pH 9 liegt. Der Median beträgt pH 6,2.

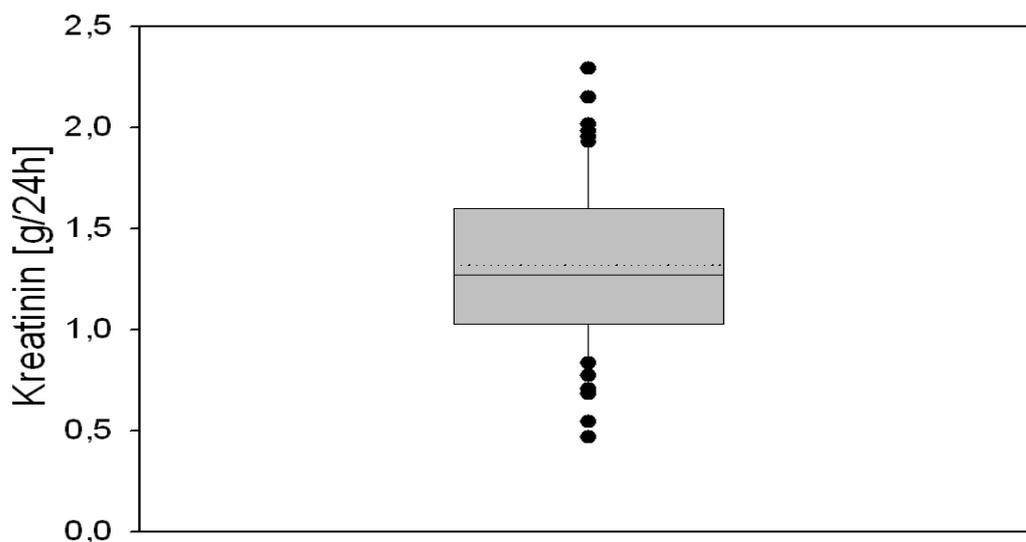


Abbildung 68: Native 24h-Sammelurine: Verteilung (Boxplot) der ermittelten Kreatininwerte; Gestrichelte Linie entspricht dem Mittelwert.
Richtwert: 0,6-2,1 g/24h

Der Boxplot in Abbildung 68 zeigt, dass von nahezu allen Probanden ein vollständiger 24h-Sammelurin erhalten bzw. untersucht wurde.

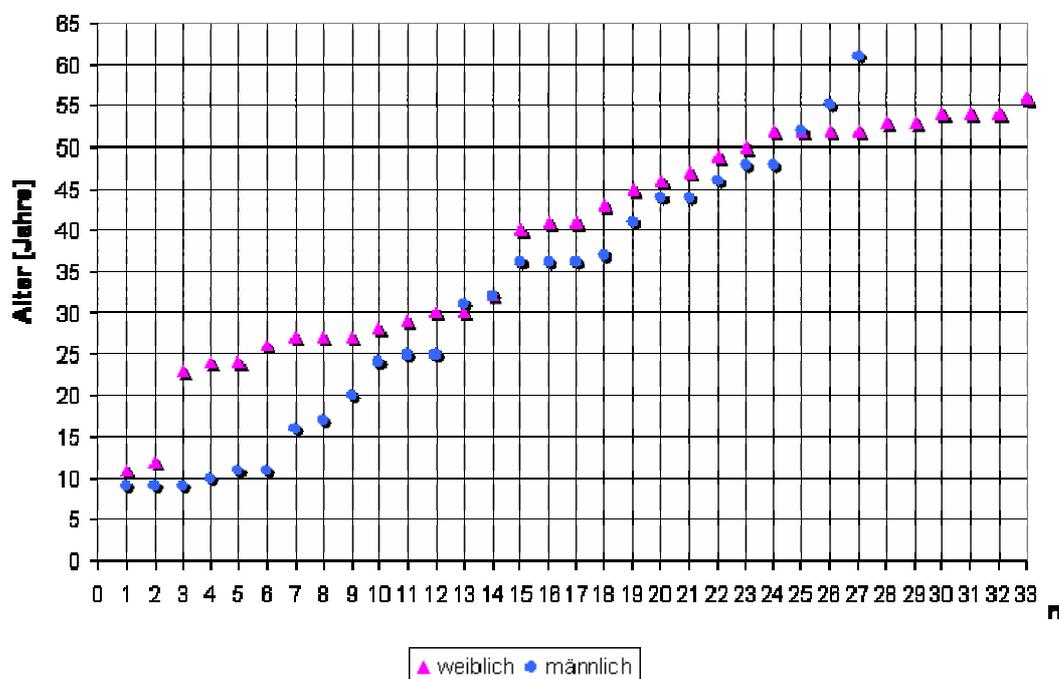


Abbildung 69: Native 24h-Sammelurine: Zusammensetzung der weiblichen und männlichen Probanden nach aufsteigendem Alter

Aus der Abbildung 69 geht hervor, dass die untersuchten Probanden-Urine bezüglich Alter und Geschlecht gut verteilt und daher repräsentativ sind.

Anhand der in Abbildung 71 dargestellten Verteilung der bei der Rücktitration verbrauchten HCl wurden, bezüglich der optimalen Stabilisierung eines 24h Urins, 54 mmol an HCl festgelegt.

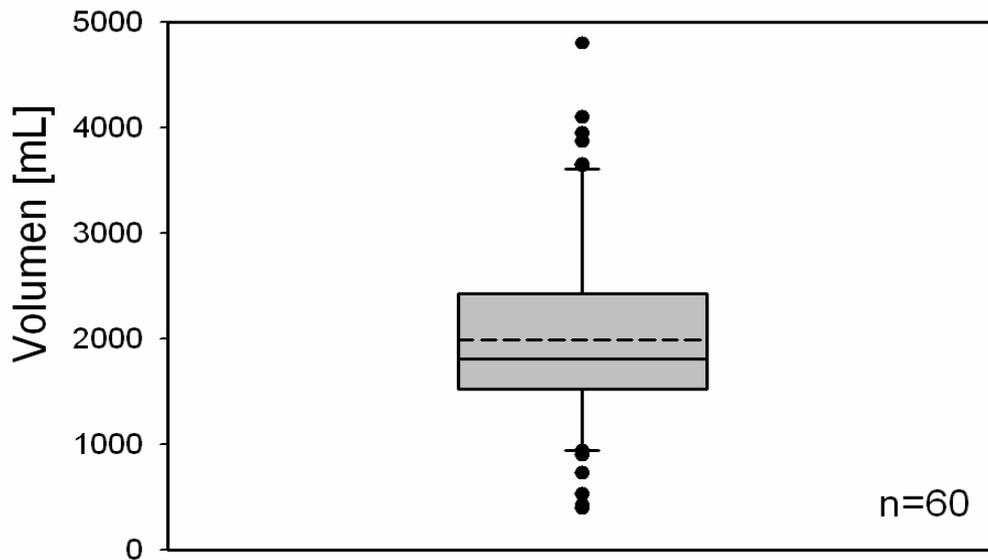


Abbildung 70: 24h-Sammelurin: Boxplot der Volumenverteilung von 60 weiblichen und männlichen Probanden; gestrichelte Linie: Mittelwert

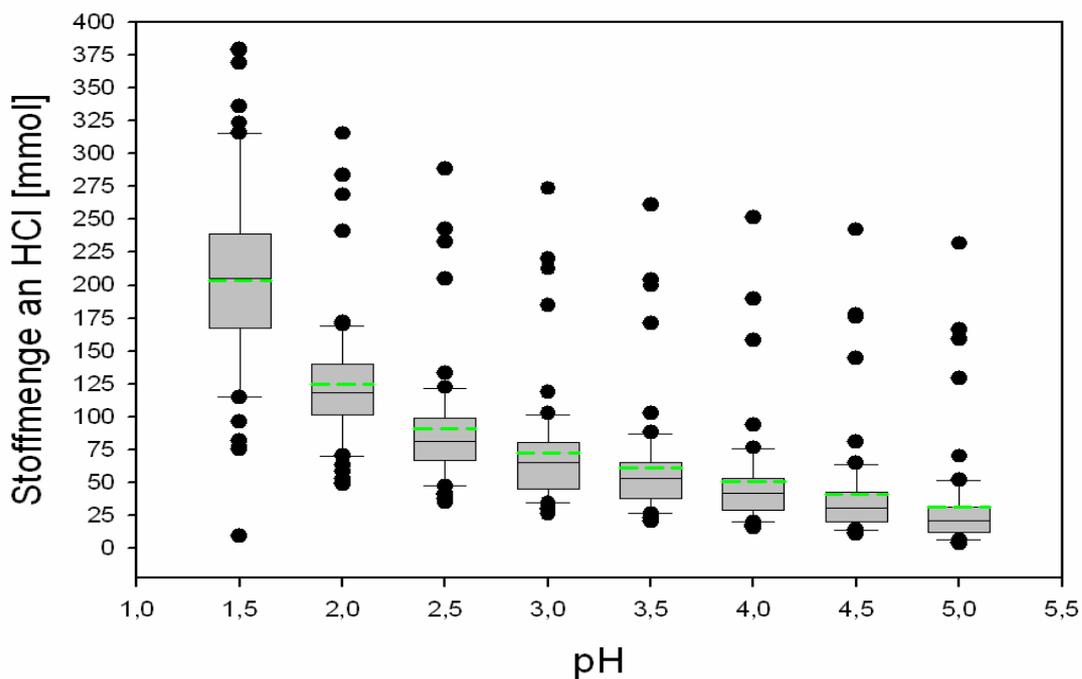


Abbildung 71: Native 24h-Sammelurine (n=60): Verteilung (Boxplots) der benötigten Stoffmenge an HCl um einen bestimmten pH-Wert zu erreichen; gestrichelte Linie: Mittelwert

6.1.4 Volumen des 24h-Sammelurins

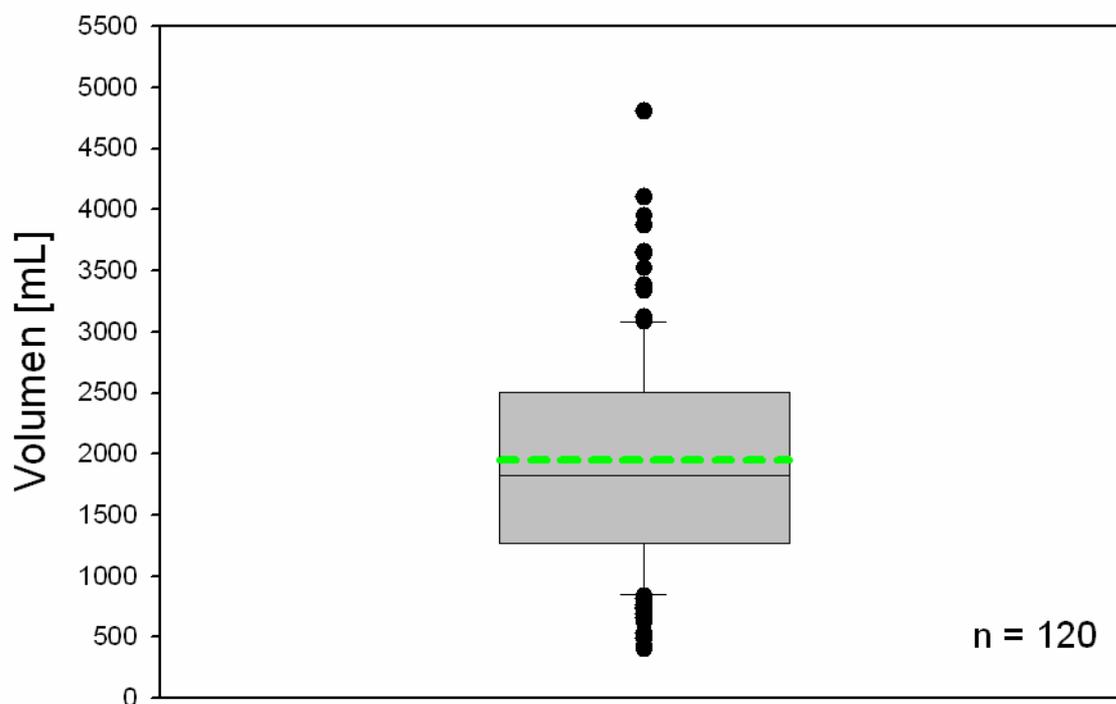


Abbildung 72: 24h-Sammelurin: Boxplot der Volumenverteilung von 120 männlichen und weiblichen Probanden; gestrichelte Linie: Mittelwert

In einer zweiten Studie zur Volumenverteilung wurden ebenfalls 60 Probanden einbezogen. In Abbildung 72 sind die Ergebnisse beider Studien zusammengefasst. Aus dem Boxplot geht hervor, dass ein Sammelbehälter mit einem Volumen von 3 L benötigt wird um 95 % aller 24h-Sammelurine zu erfassen. Die meisten der bis heute verwendeten Sammelbehälter haben ein Fassungsvermögen von nur 2 L.

6.1.5 Lichtschutz

Die untersuchten Katecholamine sind lichtempfindlich, d.h. sie werden durch Tageslicht oxidiert. Ein optimaler Sammelbehälter sollte daher einen entsprechenden Lichtschutz aufweisen. Um zu überprüfen, ob der in Rahmen dieser Arbeit neu entwickelte Sammelbehälter einen ausreichenden Lichtschutz bietet, wurden die im Folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt.

Ein Aliquot (200 mL) eines entsprechend Kapitel 6.1.2.6 gewonnenen 24h-Sammelurin-Pools (n=7) wurde in einem klaren, verschlossenen Plastikgefäß über 10 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt. In bestimmten Abständen (siehe Abbildung 73) wurde mit Hilfe des in Kapitel 6.2.2 beschriebenen on-line SPE-HPLC-ECD Verfahrens die Wiederfindung der Katecholamine Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin bestimmt. Wie aus Abbildung 73 ersichtlich ist, werden die Katecholamine bei Tageslicht innerhalb von 2 Tagen weitgehend abgebaut, d.h. oxidiert. In einem parallelen Versuchsansatz wurde der neu entwickelte und entsprechend eingefärbte Sammelbehälter für die Lagerung benutzt. Wie aus Abbildung 74 hervorgeht werden die Katecholamine bei Verwendung dieses Sammelbehälters über einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen nicht oxidiert.

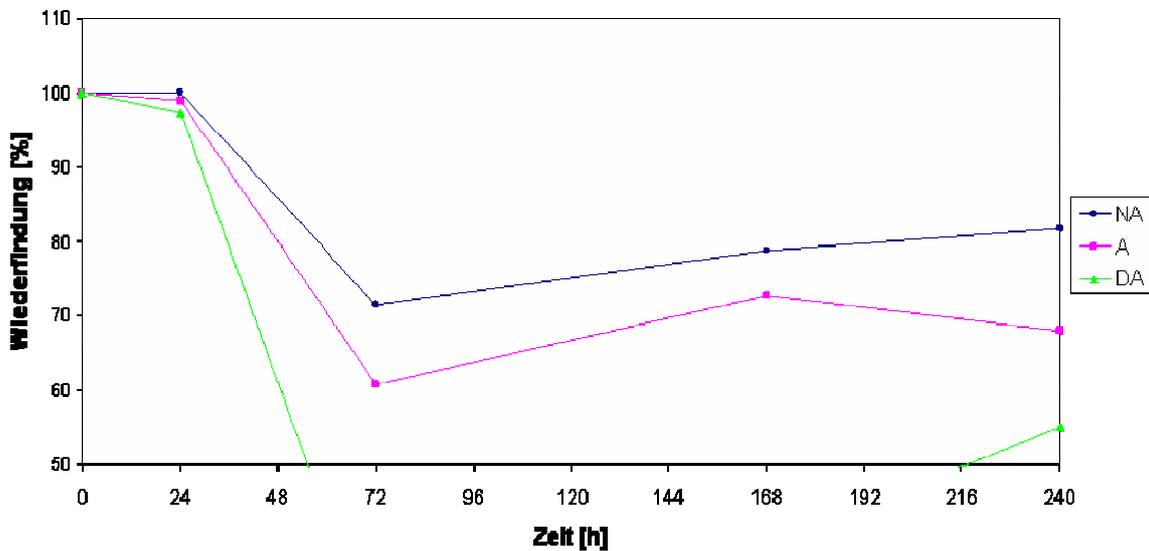


Abbildung 73: Wiederfindung (Stabilität) von Katecholaminen (Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin) bei Lagerung (Raumtemperatur) von 24h-Urin ohne Lichtschutz

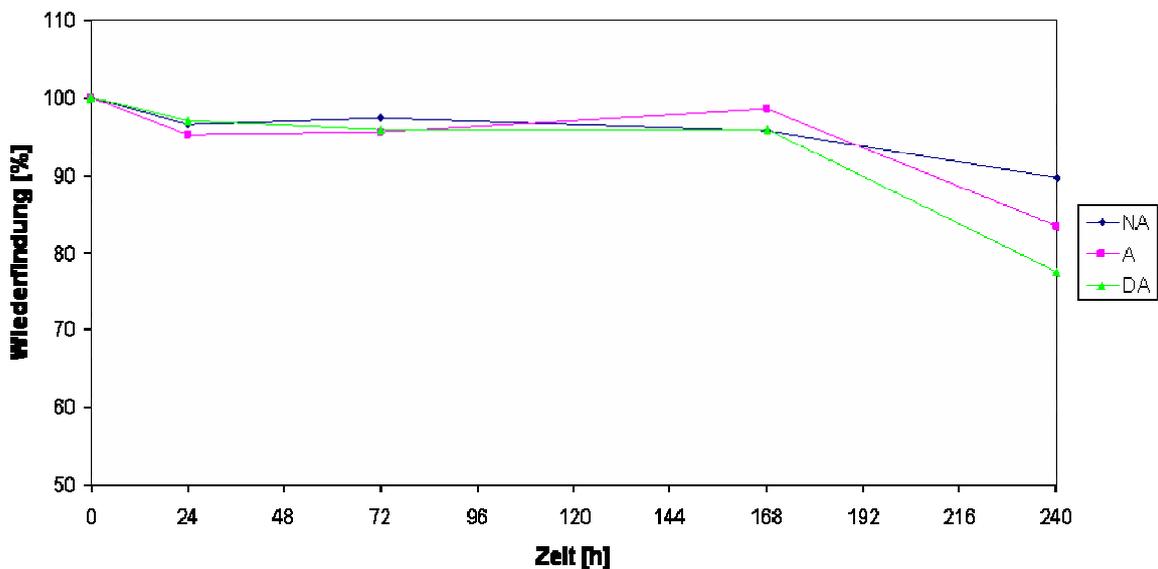


Abbildung 74: Wiederfindung (Stabilität) von Katecholaminen (Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin) bei Lagerung (Raumtemperatur) von 24h-Urin unter Lichtschutz

6.1.6 Kommerziell erhältliche Behälter für die Sammlung von 24h-Urin

In Abbildung 75 ist eine Auswahl von kommerziell erhältlichen Sammelgefäßen abgebildet. In der oberen Reihe befinden sich die vorwiegend auch in Deutschland verwendeten Behälter. Diese Behälter sind für die Sammlung eines 24h-Urins nur mit Einschränkung zu gebrauchen, da sie ein Volumen von nur 2 L aufweisen und keinen Griff besitzen. Darüber hinaus wird eine korrekte Ablesung des Volumens durch die dunkelbraune Einfärbung sehr erschwert. Die Behälter in der unteren Reihe besitzen zwar einen Griff, sind aber lichtdurchlässig und damit wie in Kapitel 6.1.4 aufgezeigt nicht für die Sammlung von Katecholaminen geeignet. In den Abbildungen 76 und 77 sind beispielhaft zwei Gebrauchsanleitungen zum Sammeln von 24h-Urin aufgeführt. Zunächst ist kein Hinweis darauf, dass z.B. ätzende Salzsäure vorgelegt ist. Darüberhinaus sind die Anweisungen unverständlich, insbesondere für ältere Patienten. Die Lagerung der Sammelflasche im Kühlschrank ist unhygienisch.



Abbildung 75: Beispiele für Urin-Sammelgefäße

— 1900 **Behälter für Sammelurin**
— 1800 Kühl lagern!

— 1700 **Urin sammeln nach Anweisung des Arztes.**
Der Arzt sagt Ihnen, wieviel Sie trinken müssen
und oder ob bestimmte Medikamente bzw.
Lebensmittel fortgelassen werden sollen.

— 1600 **Den gesammelten Urin sofort abgeben!**
24-Stunden-Urin kann verschiedenartig
gesammelt werden:

— 1500 **1.** Nach der Uhrzeit von morgens 8.00 Uhr
— 1400 bis morgens 8.00 Uhr (Dadurch erfaßt man
einen Morgenurin).

— 1300 **2.** Man beginnt mit dem ersten Urin nach dem
nicht eingefüllten Morgenurin und sammelt
dann jeden Urin einschließlich des Morgenurins
am folgenden Tage.

— 1200 **3.** 24-Stunden-Sammelurin auf Tuberkulose. Am
Tag des Sammelns sogut wie nichts trinken.
Morgenurin-Tagurin-Nachturin-Morgenurin.

— 1100 Der Urin enthält zwei Morgenurine. Eher abends
eine Urinportion weglassen, um noch den
— 1000 nächsten Morgenurin einfüllen zukönnen.
Medikamente gegen Tuberkulose 5 Tage vor der
Urinsammlung weglassen.

— 900 Nachweis günstiger bei blutigem Urin, der
Sammelurin kann auch Menstrualblut enthalten.
Bei Untersuchung auf Tuberkulose möglichst in

— 800 gleicher Art drei Urine, z.B. jeweilig Sonntags
sammeln.

— 700 Abgabe des Urins dann gleich am Montagmorgen.

— 600 Name Vorname
geb.
Wohnort

— 500 Urin gesammelt von bis
Zu untersuchen auf:
Überweisender Arzt

— 400

— 300

— 200 **NORBERT KUHNLE**
Laborbedarf für Medizin und Forschung
76229 Karlsruhe

Abbildung 76: Beispiel a) Gebrauchsanweisung

Behälter für Sammelurin

1. Morgens Blase in der Toilette entleeren und Uhrzeit notieren.
2. Danach jeden Urin im Verlauf des Tages und der folgenden Nacht ins viereckige Sammelgefäß ablassen.
Vor jedem Stuhlgang zuerst den Urin in die Sammelflasche ablassen.
3. Am nächsten Morgen zur gleichen wie am Vortag notierten Zeit, Blase in das Sammelgefäß entleeren.
4. Urin gut mischen.
5. Urinmenge an der Skala ablesen und die Menge ins Schriftfeld der Sammelflasche bzw. eines kleineren Transportbehälters eintragen.
6. Ggf. einen Teil des Urins in den Transportbehälter füllen und zum Arzt bringen.
7. Urin-Sammelflasche im Kühlschrank lagern. Flasche und Verschluss sind absolut dicht und lassen keinen Uringeruch durch.

Kühl lagern!

Datum _____

Name _____

geb. _____

Station _____

Menge _____ ml

von _____ bis _____ Uhr

•nerbe plus•

Laborartikel D-21423 Winsen/Luhe

Abbildung 77: Beispiel b) Gebrauchsanweisung

6.1.7 24h-Urin Sammelkit: UriSet 24

Basierend auf den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse und Erkenntnisse wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Sarstedt AG & Co. erstmalig ein Komplett-Set für die standardisierte und patientenfreundliche 24 Stunden Urinsammlung, das UriSet 24 (siehe Abbildung 78) entwickelt und hergestellt.



Abbildung 78: UriSet 24: Aufriss-Darstellung der Sammelflasche und der enthaltenen Set-Komponenten

6.1.7.1 Komponenten des UriSet 24

Das Komplett-Set für die standardisierte 24 Stunden Urinsammlung setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen (siehe auch Abbildung 79):

- a) Sammelflasche
- b) Auffang- und Umfüllbecher
- c) Glasflasche
- d) Transportgefäß
- e) Gebrauchshinweis
- f) Etikett



Abbildung 79: Komponenten des UriSet 24: Sammelflasche, Glasflasche, Auffang- und Umfüllbecher, Transportgefäß, Etikett, Gebrauchshinweis

a) Sammelflasche

Die braun eingefärbte Sammelflasche garantiert einen hohen Lichtschutz für empfindliche Analyte wie z.B. die Katecholamine. Der Behälter besitzt ein

Fassungsvolumen von 3 Litern. Hierdurch können über 90 % aller ausgeschiedenen 24h-Urine erfasst werden. Die neuartige Flaschengeometrie mit ergonomischer Griffmulde (Abbildung 78) und extra großem Öffnungsdurchmesser ermöglicht einen optimalen Gebrauch durch die Patienten. Die detaillierte Skala und der transparente Sichtstreifen sorgen für ein einfaches Ablesen der Füllmenge und führen somit zu einer hohen Ablesegenauigkeit.

b) Auffang- und Umfüllbecher

Das Fassungsvermögen von 500 mL garantiert ein vollständiges Auffangen des Urins bei jeder Miktion. Der Urin wird anschließend jeweils in die Sammelflasche entleert. Der große, flexible Öffnungsdurchmesser des Bechers erleichtert insbesondere Kindern und weiblichen Patienten die Urinsammlung, da das Ausscheiden in den Becher und nicht in die Flasche erfolgen kann. Nach Beendigung der Sammlung kann dieser Becher zum praktischen Umfüllen des Urins in das Transportgefäß verwendet werden.

c) Glasflasche

Die im Set enthaltene standardisierte Menge (54 mmol) und Konzentration an Salzsäure (9 mL 20 %ig) ist in einer 10 mL-Glasflasche mit Sicherheitstropfer vordosiert. Die Tropfzeit für die Entleerung des gesamten Stabilisators aus dem Fläschchen beträgt 14 Sekunden. Eine Verätzungsgefahr ist weitgehend auszuschließen, da verdünnte Salzsäure verwendet wird. Die Säure wird auch nicht vorgelegt, sondern erst nach der ersten Urinfraktion in den Sammelbehälter zugetropft. Der spezielle Sicherheitstropfer schützt vor Austreten der verdünnten Salzsäure beim versehentlichen Umfallen der Glasflasche. Der eingesetzte Tropfaufsatz (Zentraltropfer) ermöglicht nur ein Auslaufen der Flüssigkeit in vertikaler d.h. kopfüber Stellung der Glasflasche. UriSet 24 kann – wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben – für folgende diagnostisch relevante Markermoleküle eingesetzt werden: Katecholamine, Metanephrine, Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure, und 5-Hydroxyindolessigsäure. Durch die

damit verbundene Langzeitstabilität von 7 Tagen bei Raumtemperatur können die Urinproben gesammelt und batchweise abgearbeitet werden. Dies führt zu einem deutlich wirtschaftlicheren und effizienteren Probenmanagement.

d) Transportgefäß

Der Kit ermöglicht es, dass nicht - wie bisher - die gefüllte Sammelflasche, sondern lediglich das beiliegende 30 mL Transportgefäß mit UV-Lichtschutz, etikettiert zum Arzt oder ins Labor gelangt. Damit wird den neuen Richtlinien für Probentransport P 650 entsprochen [299]. In letzteren wird festgelegt, dass potentiell infektiöses Material ab einem Volumen von 500 mL nicht, bzw. nur mit einer speziellen Umverpackung, transportiert werden darf. Zudem wird auch das Labor entlastet, da die große Sammelflasche nicht mehr im Labor entsorgt (Geruchsbelästigung) werden muss. Das Transportgefäß lässt sich dicht verschließen und ohne Probleme hygienisch verschicken. Die Abmessungen des Transport- und Lagergefäßes wurden so gewählt, dass es in Standardeinsätze für die Zentrifugation und Lagerung passt.

e) Gebrauchshinweis

Die richtige Vorgehensweise zum Sammeln eines 24-Stunden-Urins ist im mehrsprachigem „Beipackzettel“ leicht verständlich wiedergegeben (siehe Abbildung 79) und durch Piktogrammen anschaulich gemacht. Der Gebrauchshinweis ist auch einzeln in 8 verschiedenen Sprachen erhältlich. Der Wortlaut für den Gebrauchshinweis in deutscher Sprache ist in Abbildung 80 wiedergegeben.

D Gebrauchshinweis

UriSet 24

Entleeren Sie am Morgen nach dem Aufstehen die Blase in die Toilette. Notieren Sie Datum und Uhrzeit auf dem beigefügten Etikett (E).

1. Benutzen Sie zum Auffangen des nächsten Urins den Auffangbecher (B) und geben Sie diesen Urin in die Sammelflasche (A).
2. Danach tropfen Sie den gesamten Inhalt (Säure) aus dem Glasfläschchen (D) in die Sammelflasche (A).

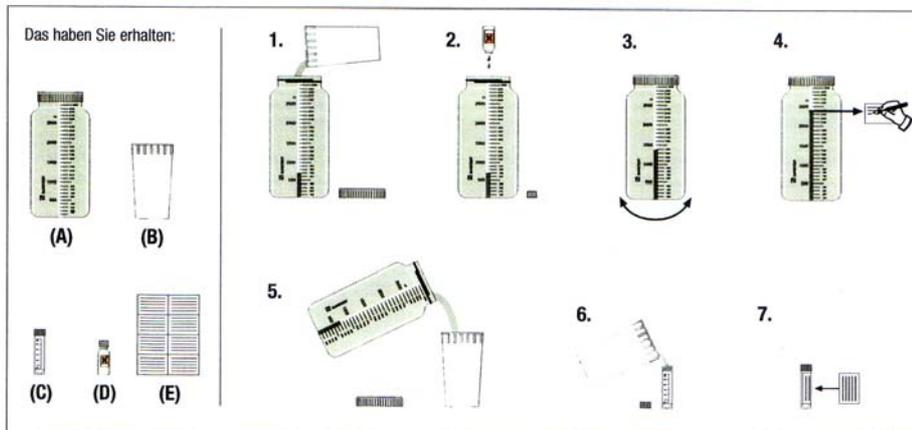


Das Fläschchen enthält 9 ml Salzsäure 20 %
 Reizt die Augen, die Atmungsorgane und die Haut.
 Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren.
 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen).

3. Verschließen Sie die Sammelflasche (A) gut und schwenken Sie diese. Sammeln Sie jeden weiteren Urin, auch bei Stuhlgang, und geben Sie diesen in die Sammelflasche (A). Verschließen Sie nach jeder Zugabe die Sammelflasche (A) gut und schwenken Sie diese. Gehen Sie am nächsten Tag zu der am Vortag notierten Uhrzeit auf die Toilette und sammeln Sie diesen Urin. Die Sammlung ist damit beendet.
4. Lesen Sie die gesammelte Menge an der Skala auf der Sammelflasche (A) ab. **Tragen Sie diese Zahl auf dem Etikett (E) ein.** Füllen Sie das Etikett (E) vollständig aus.
5. Geben Sie etwas Urin aus der Sammelflasche (A) in den Auffangbecher (B).
6. Füllen Sie das 30 ml-Röhrchen (C) bis zur 30 ml-Markierung mit dem Urin. Den restlichen Urin aus dem Becher (B) und der Sammelflasche (A) bitte in die Toilette entleeren.
7. Verschließen Sie das Röhrchen (C). Kleben Sie das ausgefüllte Etikett (E) auf. Geben Sie das gefüllte Röhrchen (C) bei Ihrem Arzt ab.
 Alle Bestandteile des Sammelurin-Sets können mit dem Hausmüll entsorgt werden.

(A): Sammelflasche (B): Auffangbecher (C): 30 ml-Röhre
 (D): Glasfläschchen mit 9 ml Salzsäure 20 % (E): Etikett für 30 ml-Röhre

Zur in-vitro Diagnostik / Lagerung bei Raumtemperatur



GB39a-1003-0804 D intern

Technische Änderungen vorbehalten

Ⓢ / For single use only



SARSTEDT
 Aktiengesellschaft & Co.
 D-51588 Nümbrecht

Abbildung 80: Beispiel des in deutscher Sprache verfassten Gebrauchshinweises für das Sammeln eines 24h-Urins mit dem UriSet 24.

f) Etikett

Das übersichtlich gestaltete und selbstklebende Etikett ist ebenfalls in

verschiedenen Sprachen erhältlich. Der Patient soll folgende Angaben machen: Name und Vorname, Geburtsdatum, Körpergewicht, Männlich/Weiblich, Beginn der Sammlung mit Datum und Uhrzeit, Ende der Sammlung mit Datum und Uhrzeit sowie das gesammelte Urinvolumen.

6.1.8 Einführung des UriSet 24

Das Komplet Set für die standardisierte 24h-Urinsammlung wurde im Dezember 2004 eingeführt. Im Rundschreiben „III / 2004 Labor aktuell“, welches eine hausinterne Information für die Kliniken und Institute des Klinikums Grosshadern sowie für externe Einsendern des Institutes darstellt, erfolgte die Mitteilung der „Einführung eines neuen Komplet-Systems zur Sammlung von angesäuerten Urin (Urin-Sammelkit „UriSet 24“, Firma Sarstedt)“.

Darin heißt es unter anderem: „Für die Bestimmung einer Reihe endokrinologischer Parameter wird Sammelurin benötigt, der zur Stabilisierung der Analyten auf einen pH-Wert von ≤ 5 angesäuert sein muss (bes. Katecholamine, Metanephrene, 5-Hydroxyindol-Essigsäure). Bislang wurde für entsprechende Urinsammlungen vom Institut für Klinische Chemie 25 mL-Fläschchen mit 30 %iger Salzsäure ausgegeben, die zu Beginn der Sammelperiode in das Urinsammelgefäß eingefüllt werden mussten. Jetzt ist ein konfektionierter Urin-Sammelkit kommerziell verfügbar geworden, der nach Auffassung einer vor einigen Monaten versuchsweise damit ausgestatteten Ambulanz des Hauses eine wesentliche Komfortverbesserung in der Handhabung sowohl für Patienten als auch Pflegepersonal gegenüber dem bisherigen Vorgehen bedingt..... Sammelbecher und auslaufgesichertes Säurefläschchen verbessern Hygiene und Sicherheit die der Urinsammlung gegenüber dem bisherigen Vorgehen deutlich..... Unter Berücksichtigung aller bisher für die Sammlung von angesäuertem Urin erforderlichen Einzelkomponenten ist ein Wechsel auf das neue Komplet-System kostenneutral. Das Institut für Klinische Chemie wird daher künftig anstelle von

Säurebehältnissen zur Sammlung von angesäuerten Urin für die eingangs genannten Untersuchungen den neuen Urinsammelkit UriSet 24 ausgeben...gez. OA Dr. med. P. Cremer“.

6.1.9 UriSet 24: Anwendungsbeobachtung

Die Anforderungen an das UriSet 24 und dessen Praktikabilität wurden an 50 Patienten in einer Anwendungsstudie bzw. -beobachtung überprüft. In den entsprechenden 24h-Sammelurinen wurde Kreatinin und der pH-Wert bestimmt. 44 % der Patienten waren weiblichen und 56 % männlichen Geschlechtes. Das Durchschnittsalter lag bei 56,2 Jahren, wobei der Jüngste 18 Jahre alt war und der Älteste 76 Jahre.

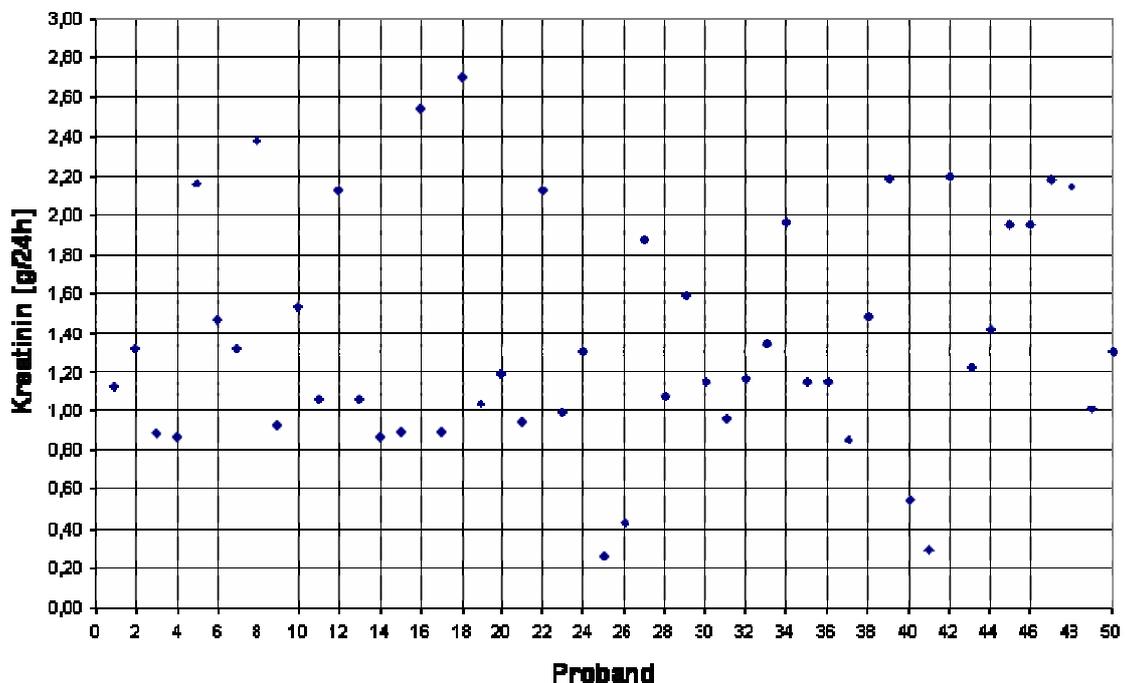


Abbildung 81: Anwendungsstudie: Kreatininwerte der 50 Patienten

Ca. 90 % der Kreatininwerte lagen im Richtbereich von 0,6-2,1g/24h. Zieht man das hohe Alter der Patienten in Betracht, dann kann man auch bei den restlichen 10 % von einer vollständigen 24h-Urinsammlung ausgehen.

Das Gesamtvolumen eines 24h-Urins lag im Durchschnitt bei 2000,5 mL. Das Volumen des entwickelten 3L-Sammelgefäßes reichte somit bei 94 % der Patienten aus. Der entsprechende Boxplot ist in Abbildung 82 abgebildet.

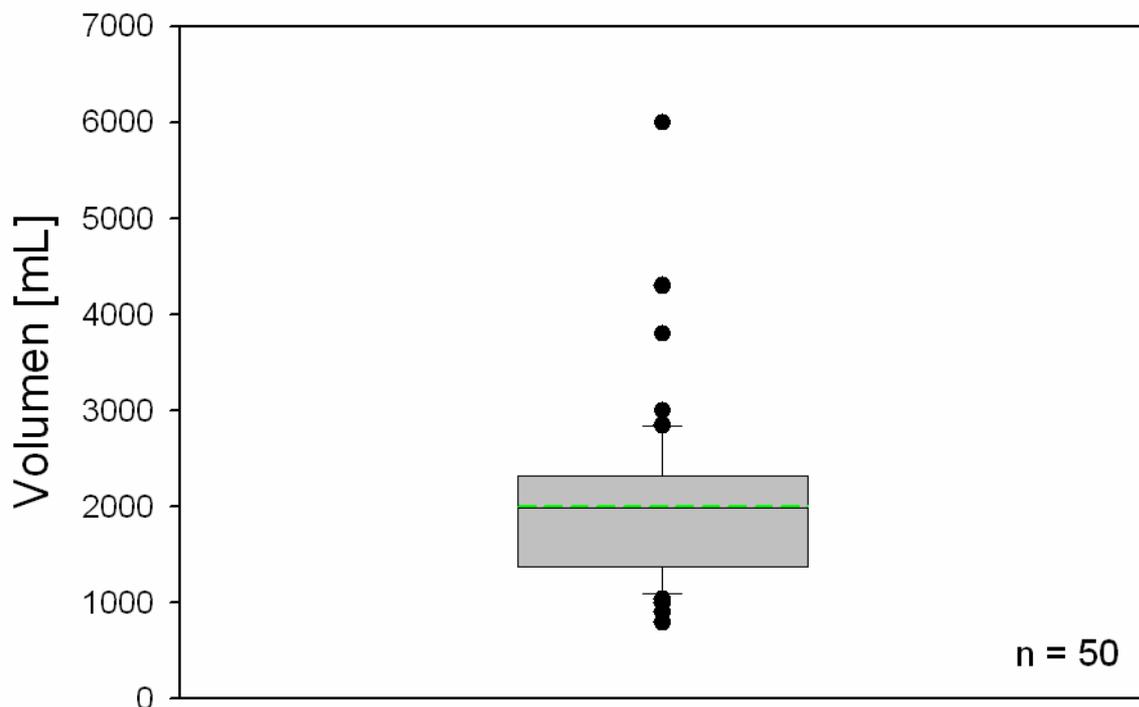


Abbildung 82: Boxplot der Volumenverteilung der 24h-Sammelurine von 50 Patienten. Gestrichelte Linie: Mittelwert

Die 5. Perzentile beträgt 1000 mL, die 25. Perzentile 1400 mL, die 50. Perzentile 1980 mL, die 75. Perzentile 2200 mL und die 95. Perzentile 3800 mL. Abbildung 83 zeigt, dass die bei Verwendung des UriSet 24 gesammelten Urine den erforderlichen pH Bereich von $\geq 1,5$ und ≤ 5 aufweisen. Somit ist eine Stabilisierung der untersuchten Markermoleküle garantiert. Der Mittelwert lag bei pH 3,1; die 90. Perzentile bei pH 4,2; der Median bei pH 3,0 und die 10. Perzentile bei pH 2,1.

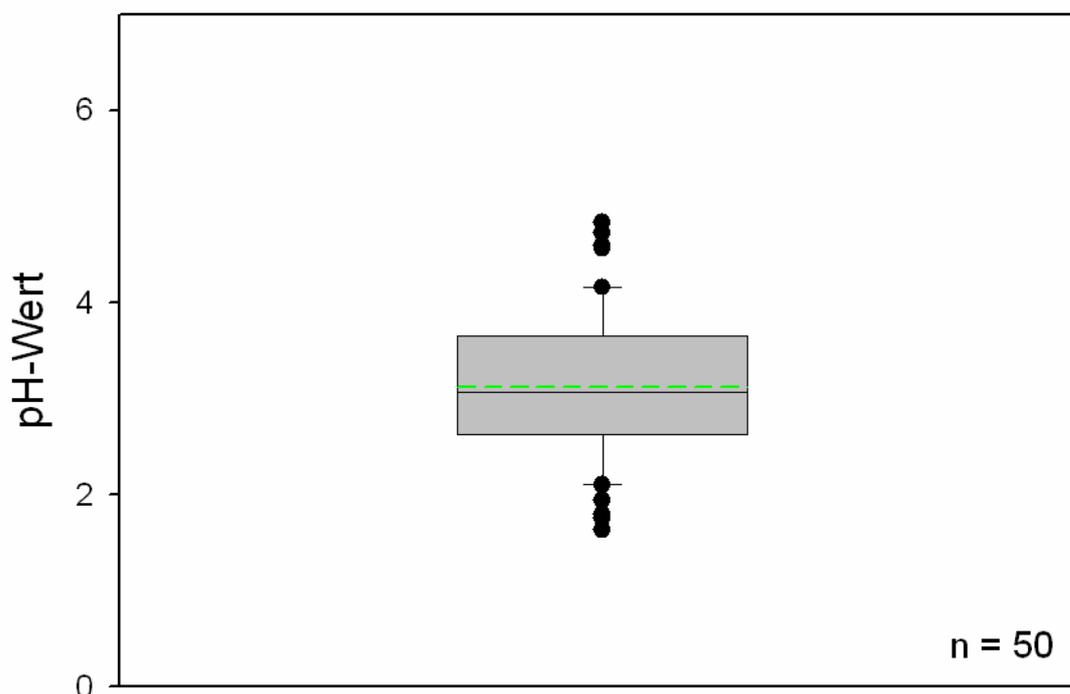


Abbildung 83: Boxplot der Verteilung der pH-Werte der 24h-Sammelurine von 50 Patienten. Gestrichelte Linie: Mittelwert

Die bei dieser Anwendungsbeobachtung erbetene Beurteilung der Anwendbarkeit des UriSet 24 war durchweg positiv, sowohl von Seiten der Patienten wie auch des Pflegepersonals. Die Praktikabilität, die Compliance, der Komfort und die Hygiene wurden mit dem neuartigen Sammelsystem wesentlich verbessert. Von Seiten der Station wurde auch der Wunsch artikuliert, generell für die Sammlung von Urin, wie beispielsweise für die Bestimmung der Kreatinin-Clearance, das UriSet 24 zu verwenden. Daraufhin wurde von der Firma Sarstedt ein UriSet 24- Komplettsystem ohne Stabilisator (Salzsäure) ebenfalls erfolgreich eingeführt.

6.2 Analytik der Katecholamine

6.2.1 Entwicklung eines automatisierten HPLC Analyseverfahrens für Katecholamine in Urin mit integrierter Probenaufbereitung und elektrochemischer Detektion (ECD)

Im Rahmen dieser Arbeit sollte für die Quantifizierung der Katecholamine Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin im 24h-Sammelurin ein vollständig automatisiertes Analyseverfahren entwickelt und validiert werden.

Die Extraktion und Anreicherung der Katecholamine sollte mittels Festphasenextraktion (Solid Phase Extraktion, SPE) über eine im Analysensystem integrierte SPE-Säule erfolgen. Die nachfolgende Trennung der Analyte sollte konventionell an einer Umkehrphase erzielt werden. Die Detektion sollte jedoch nicht – wie bereits in der Literatur beschrieben – über die natürliche Fluoreszenz sondern erstmalig elektrochemisch mit hoher Selektivität und Empfindlichkeit erfolgen.

Hierzu musste zunächst eine sogenannte Zwei-Säulen-Kopplung bzw. Schaltung installiert und programmiert werden.

6.2.1.1 Apparativer Aufbau eines Zwei-Säulen HPLC-Systems

Der modulare Aufbau eines Zwei-Säulen-HPLC-Systems für die integrierte Probenaufbereitung ist in Abbildung 84 schematisch dargestellt. Das System setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

2 HPLC-Pumpen, eine SPE-Säule (gepackt mit einem maßgeschneiderten Packungsmaterial), eine konventionelle analytische Trennsäule, ein entsprechender Detektor und ein automatischer Probengeber. Die SPE-Säule und die analytische Trennsäule sind über ein elektrisches Sechs-Wege-Schaltventil miteinander verknüpft.

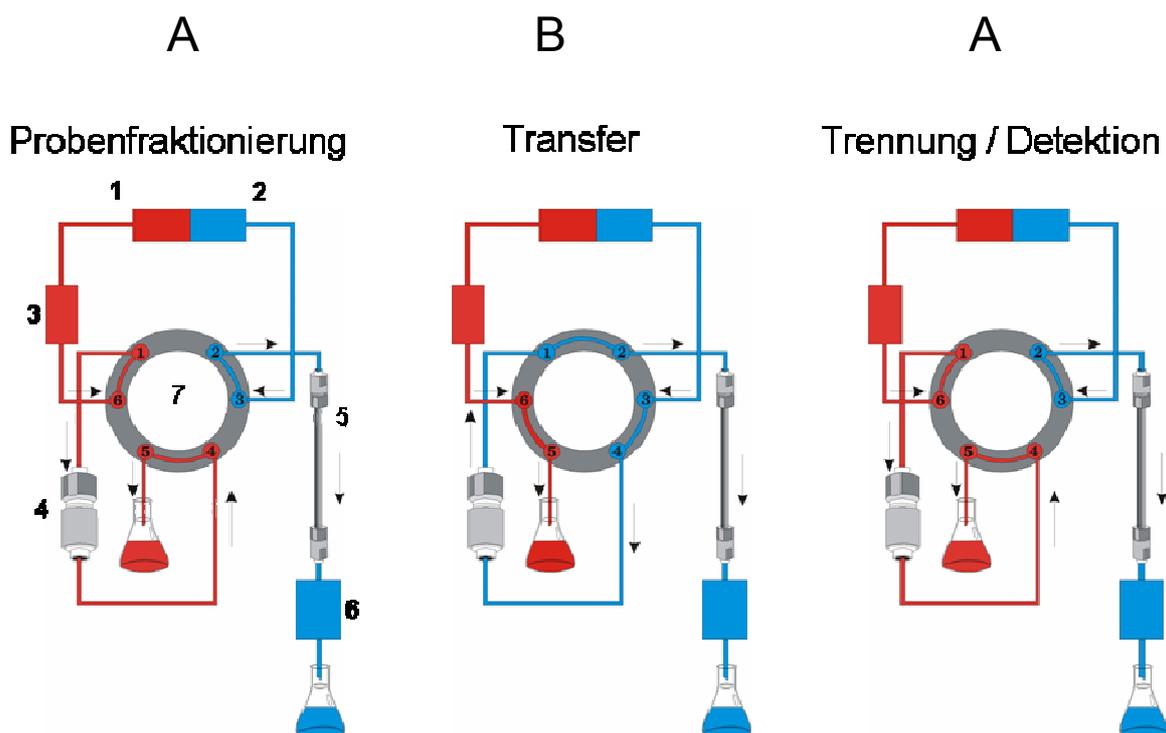


Abbildung 84: Apparativer Aufbau eines gekoppelten Zwei-Säulen HPLC-Systems; **Ventilstellung A:** Probenaufgabe und Fraktionierung bzw. analytische Trennung; **Ventilstellung B:** Transfer; 1 und 2: HPLC-Pumpen; 3: Probengeber; 4: SPE-Säule; 5: analytische Trennsäule; 6: Detektor; 7: Sechs-Wege-Schaltventil.

Eine unbehandelte biologische Flüssigkeit wird über den Probengeber auf die SPE-Säule gepumpt. Die Probe wird fraktioniert in niedermolekulare Bestandteile, welche auf der SPE-Säule reteniert bzw. angereichert werden und hochmolekulare Bestandteile, welche mit dem Totvolumen der SPE-Säule in den Abfall eluiert werden. Nach einem definierten Zeitpunkt wird das Ventil in die Stellung B geschaltet. Die auf der SPE-Säule extrahierten Analyten werden mit Hilfe eines entsprechenden Eluenten und mit Hilfe von Pumpe 2 unter Umkehrung der Flussrichtung auf die analytische Säule transferiert. Nach dem vollständigen „Transfer“ der Analyte wird das Ventil wieder in die Stellung A geschaltet. Nun erfolgt die Trennung der Analyten auf der analytischen Säule und deren Detektion. Simultan hierzu wird die SPE-Säule mit dem Eluenten konditioniert und für die nächste Injektion einer Probe vorbereitet.

6.2.1.2 Allgemeine Vorgehensweise am Beispiel der Antimykotika

Bei der Entwicklung einer robusten, zuverlässigen und vollständig automatisierten HPLC-Methode mit integrierter Probenaufbereitung müssen zunächst die einzelnen Teilschritte des Analysenzyklus ausgearbeitet und die Zeitfolge für die Schaltimpulse bestimmt werden. Die allgemeine Vorgehensweise wird in dieser Arbeit am Beispiel der Analyse von Antimykotika in Humanplasma aufgezeigt. Die untersuchten und im Rahmen des Therapeutischen Drug Monitorings analysierten Antimykotika sind: Voriconazol, Ketoconazol, Itraconazol und dessen Metabolit 1-OH-Itraconazol. Wie aus den Strukturformeln hervorgeht (Abbildung 85), besitzen diese Analyten sehr unterschiedliche Polaritäten. Daher sind die Modellanalyten insbesondere für eine beispielhafte Vorgehensweise geeignet.

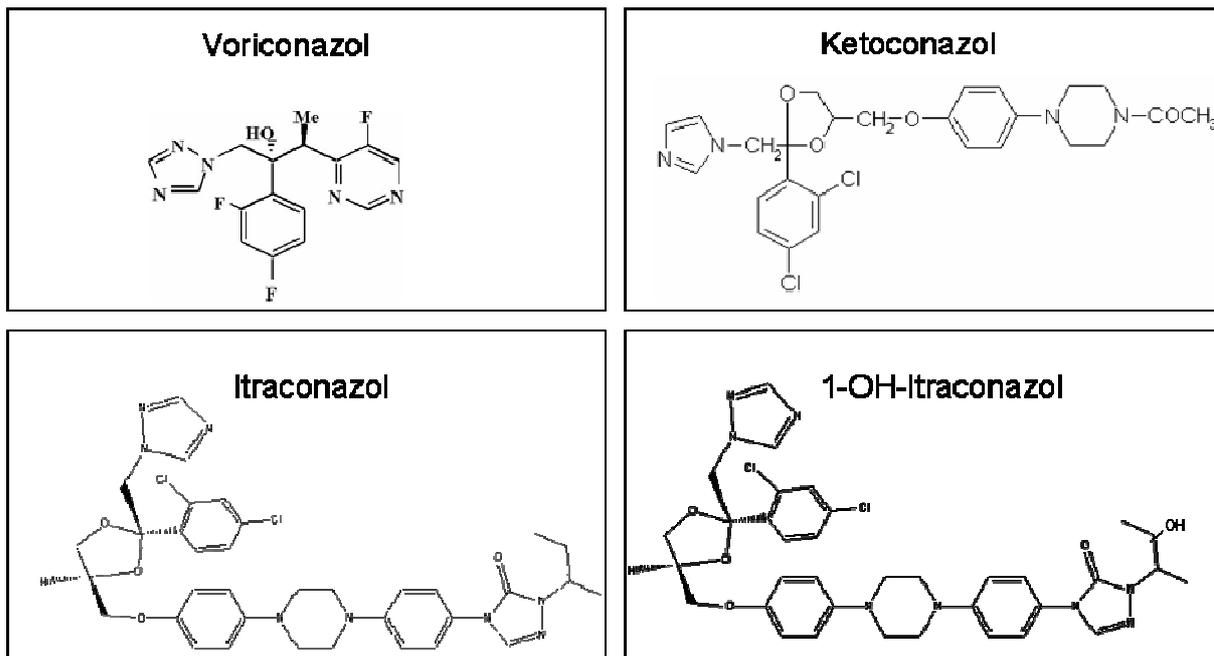


Abbildung 85: Chemische Strukturformeln der Modell-Analyten

6.2.1.2.1 Analytische Trennung (off-line) und Detektion

Zunächst müssen die optimalen chromatographischen Bedingungen für die analytische Trennung (mobile und stationäre Phase) und ein geeignetes Detektionsverfahren für die Analyten ermittelt werden. Der Einbau eines Probenaufgabeventils zwischen Pumpe 2 und Position 3 des Sechs-Wege-Schaltventils ermöglicht die direkte Injektion eines Probenstandards auf die analytische Trennsäule. Darüber hinaus kann mit dieser Anordnung die Präzision und Wiederfindung des Zwei-Säulen-Systems effektiv ermittelt und überwacht werden.

6.2.1.2.2 Abtrennung der Probenmatrix [t_M]

Zur Bestimmung der vollständigen Elution der Probenmatrix (t_M) wird die SPE-Säule des Typs B (siehe Kapitel 4.4.2) über Ventilposition 5 direkt mit dem Detektor gekoppelt (siehe Abbildung 86). Nach erfolgter Injektion der biologischen Probe (Bsp.: 100 μ L Humanplasma) auf die SPE-Säule wird dabei das Elutionsprofil der makromolekularen Probenmatrix aufgezeichnet. Die SPE-Säule sollte dabei mit einer Flussrate von 0,4-4,0 mL betrieben werden. Der Fraktionierungsschritt ist beendet, wenn der Matrixpeak die Basislinie wieder erreicht (Bsp.: 100 μ L Humanplasma: $t_M = 1$ min; Abbildung 87). Bei der Injektion von proteinhaltigen biologischen Proben (z.B. Plasma, aber auch Urin) ist darauf zu achten, dass die mobile Phase keine denaturierenden Eigenschaften (pH-Wert 4,5-7,5; hoher Anteil an organischem Modifier) besitzt. Die würde zu einer irreversiblen Verstopfung der SPE-Säule, des in-line Filters und der Kapillaren führen.

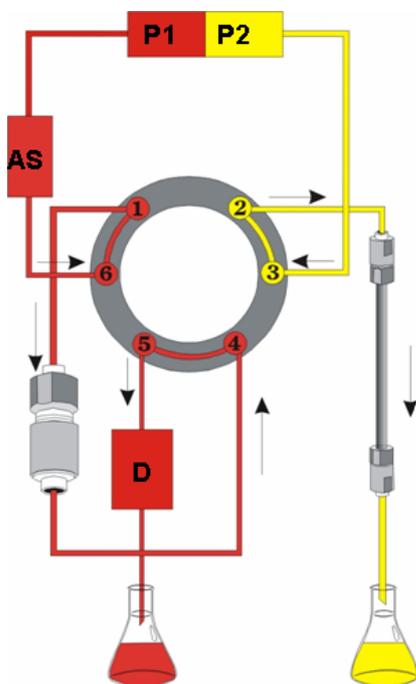


Abbildung 86: Systemaufbau zur Bestimmung von t_M und t_A .

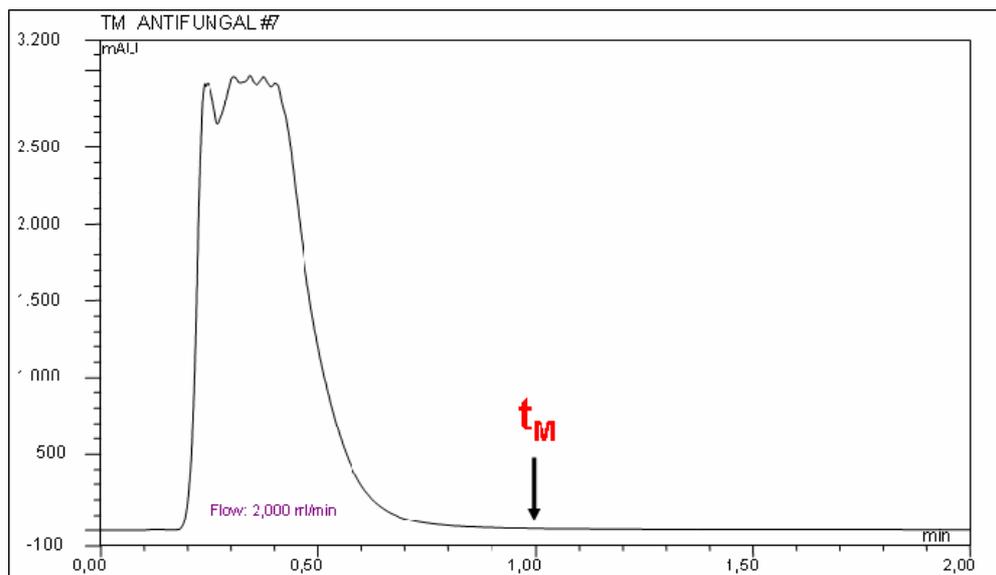


Abbildung 87: Elutionsprofil der Probenmatrix; $t_M=1\text{ min}$; SPE-Säule: LiChrospher[®] RP4 ADS, 25x4 mm ID, 25 μm ; Mobile Phase (Fraktionierung): Wasser/Acetonitril (98/2, v/v); Flussrate: 2,0 mL/min; Probe: Humanplasma; Injektionsvolumen: 100 μL ; Detektion: UV; $\lambda=280\text{ nm}$.

6.2.1.2.3 Elutionsprofil des Analyten [t_A]

Das Elutionsprofil des Analyten wird mit einer Konzentration durchgeführt, die etwa der der Realprobe entspricht. Der Systemaufbau ist wie unter Punkt 6.2.1.2.2 beschrieben. Der Detektor wird dabei direkt an die SPE-Säule gekoppelt (siehe Abbildung 86). Für die Elution des Analyten wird die gleiche mobile Phase und Flussrate verwendet, wie zur Abtrennung der Probenmatrix. Um eine quantitative Extraktion bzw. Wiederfindung des Analyten zu gewähren muss t_A größer t_M sein (Beispiel Voriconazol, der polarste der 4 Modellanalyten: $t_A = 3\text{ min}$, 100 μL Humanplasma: $t_M = 1\text{ min}$; Abbildung 88).

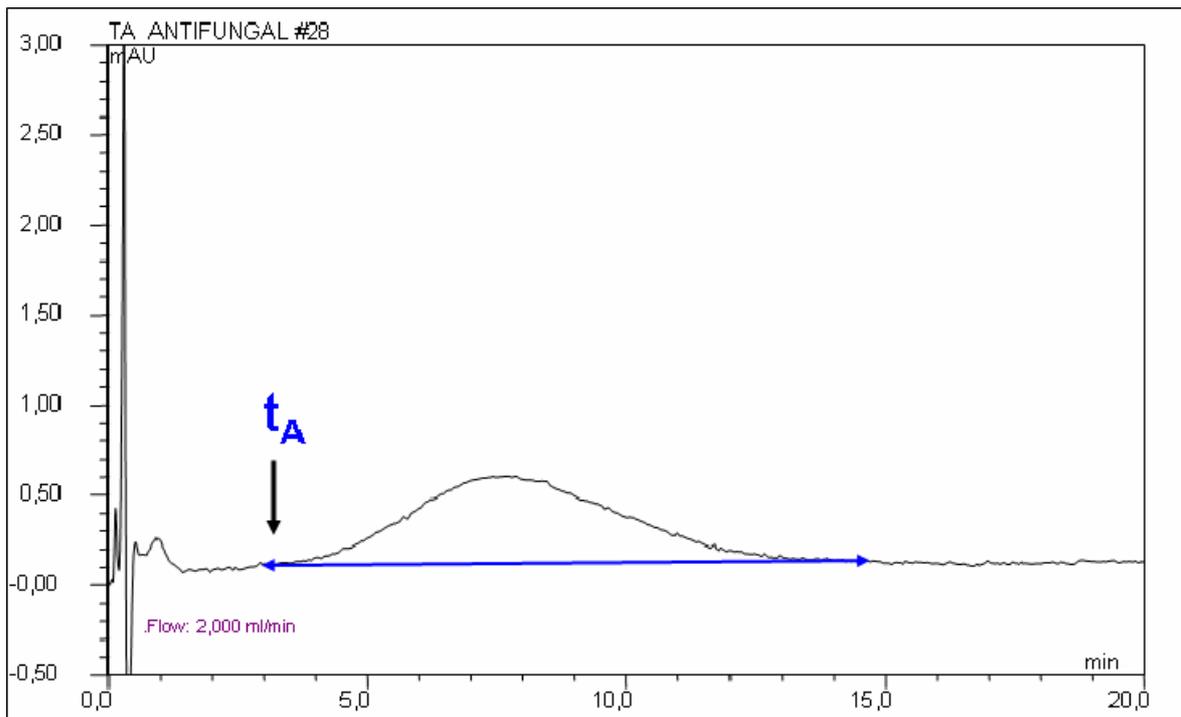


Abbildung 88: Elutionsprofil des Analyten $t_A=3\text{min}$; SPE-Säule: LiChrospher[®] RP4 ADS, 25x4 mm ID, 25 μm ; Mobile Phase (Fraktionierung): Wasser/Acetonitril (98/2, v/v); Flussrate: 2,0 mL/min; Probe: Voriconazol-Standard 2,2 mg/L; Injektionsvolumen: 100 μL ; Detektion: UV; $\lambda=260\text{ nm}$.

6.2.1.2.4 Transfer des Analyten [t_T]

Ziel dieses Analyseschrittes ist die quantitative Überführung des auf der SPE-säule adsorbierten Analyten auf die nachgeschaltete analytische Trennsäule. Dazu wird die SPE-Säule mit Position 1 und der Detektor direkt mit Position 2 des Sechs-Wege Schaltventils verknüpft (siehe Abbildung 89). Nach erfolgter Injektion des Standards und Anreicherung des Analyten auf der SPE-Säule, wird das Ventil in Position B geschaltet (siehe Abbildung 84 B). Die von Pumpe 2 geförderte mobile Phase eluiert den adsorbierten Analyten. Die Zeitspanne bis zur vollständigen Elution des Analyten von der SPE-Säule wird mit t_T bezeichnet. t_T gibt den frühest

möglichen Zeitpunkt an, bei dem das Ventil wieder in die ursprüngliche Position zurückgeschaltet werden kann (Beispiel: Itraconazol: $t_T = 2$ min; Abbildung 90).

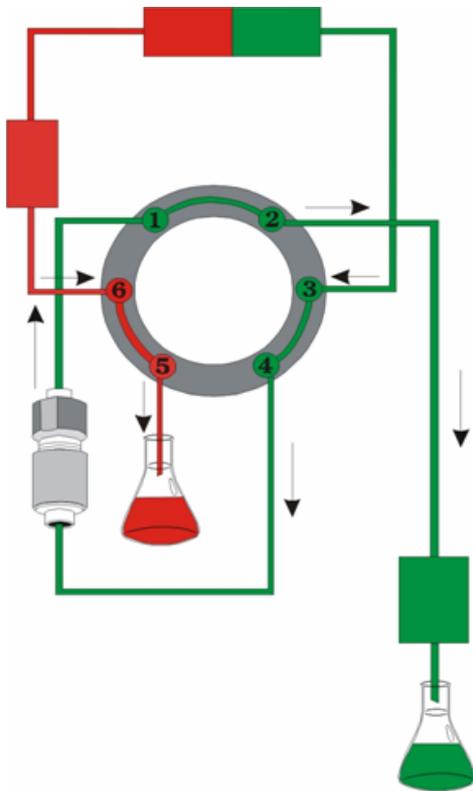


Abbildung 89: Systemaufbau zur Bestimmung von t_T .

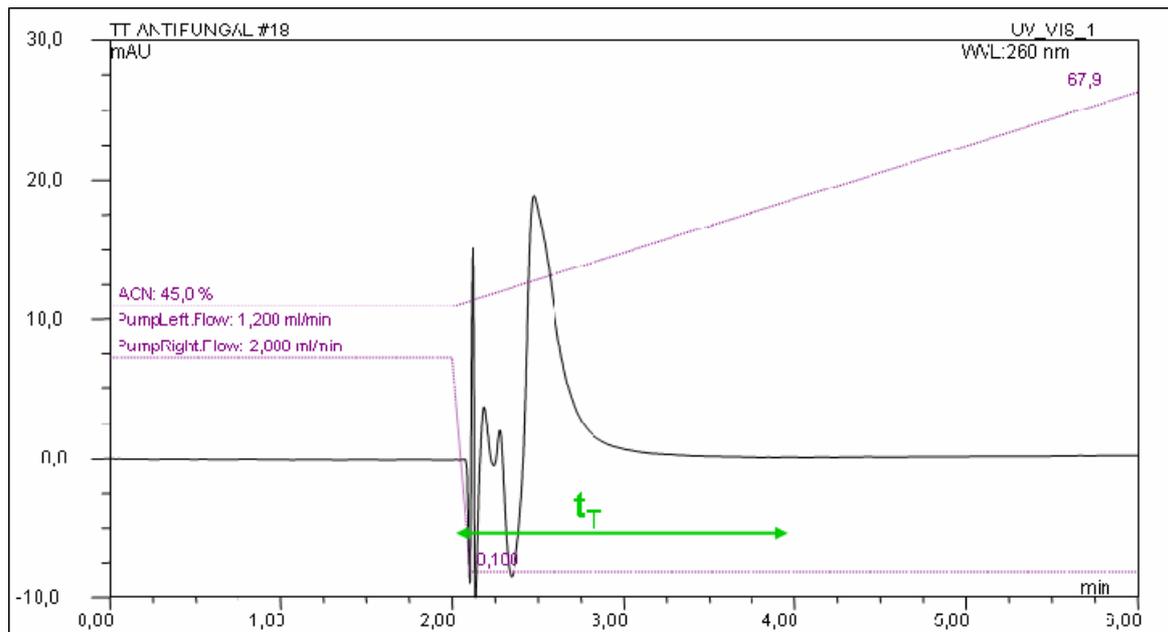


Abbildung 90: Transfer des apolaren Analyten Itraconazol; $t_T=3\text{min}$; SPE-Säule: LiChrospher® RP4 ADS, 25x4 mm ID, 25 μm ; Mobile Phase (Fraktionierung): Wasser/Acetonitril (98/2, v/v); Flussrate: 2,0 mL/min; Mobile Phase (Transfer): Ammoniumacetat (0.01M) / Acetonitril (Gradient); Flussrate: 1,2 mL/min; Probe: Itraconazol-Standard 1,3 mg/L; Injektionsvolumen: 100 μL ; Detektion: UV; $\lambda=260\text{ nm}$.

6.2.1.2.5 Apparative und methodische Anforderung für die Verwendung eines elektrochemischen Detektors (ECD)

Zitat aus der Publikation von Boos et al. 1988: „Die für den Nachweis der Katecholamine im Urin und Plasma vorwiegend eingesetzte elektrochemische Detektion wies einerseits die notwendige Empfindlichkeit und Spezifität auf, andererseits jedoch wurde die mäßige Reproduzierbarkeit und Stabilität eines elektrochemischen Detektors durch die Säulenschaltung und den Wechsel der Mobilien Phase zusätzlich beeinträchtigt und erwies sich daher für eine automatisierte Routineanalytik als wenig geeignet“ [178].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher versucht werden diese methodische Hürde zu überwinden bzw. zu umgehen. Dies gelang durch die Einführung und Optimierung einer sogenannten „Heart-Cut“ Schaltung.

6.2.1.2.5.1 *Heart-Cut [t_{HC}]*

Diese Schalttechnik ermöglicht es, die auf der SPE-Säule beim Transferschritt entstehende Mischung der beiden Eluenten bzw. deren Volumenanteil nicht in den elektrochemischen Detektor, sondern direkt in den Abfall zu leiten. Durch diesen „Heart-Cut“ wurde erstmals erreicht, dass der elektrochemische Detektor nur mit einem homogenen Eluenten durchströmt wird und somit eine sehr stabile Basislinie aufweist. Hierzu wurde die SPE-Säule mit Position 1 und die analytische Säule nebst Detektor mit Position 2 des Sechs-Wege Schaltventils verknüpft (siehe Abbildung 91). Dabei sollte t_{HC} kleiner sein als die Retentionszeit (t_R) der getrennten Analyten.

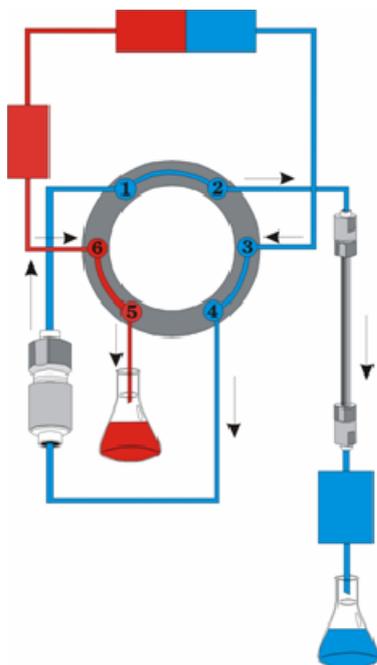


Abbildung 91: Systemaufbau zur Bestimmung von t_{HC} .

6.2.1.2.6 Berechnung der Ventilschaltzeiten [$t_{v1}/t_{v2}/t_{v3}$]

Über die Bestimmung der Ventilschaltzeiten t_{v1} und t_{v2} werden die beiden elementaren Schritte einer SPE-LC Kopplung festgelegt. t_{v3} wird nur benötigt falls die - durch den Transferschritt verursachte - Mischung der Eluenten die nachfolgende Detektion stört.

Durch t_{v1} wird der Probenaufbereitungs- bzw. Fraktionierungsschritt beendet, d.h. die SPE-Säule wird zu diesem Zeitpunkt mit der analytischen Säule gekoppelt. Durch t_{v2} wird der Transferschritt abgeschlossen, d.h. die SPE-Säule wird von der analytischen Säule entkoppelt. Bei t_{v3} wird die Ausblendung (Heart-Cut) des Detektors aufgehoben d.h. die analytische Säule wird seriell mit dem Detektor gekoppelt.

6.2.1.2.6.1 Schaltzeitpunkt Fraktionierungsschritt [t_{v1}]

Durch das Schalten des Sechs-Wege-Schaltventils zum Zeitpunkt t_{v1} wird der Probenaufbereitungsschritt beendet und die SPE-Säule in Serie mit der analytischen Säule gekoppelt (siehe Abbildung 84 B).

Als Grundlage zur Berechnung von t_{v1} dienen die vorher experimentell ermittelten Parameter t_M und t_A .

- Für Analyte mit einem t_A -Wert < 10 min folgt:

$$t_{v1} = \frac{1}{2} (t_M + t_A)$$

- Für Analyte mit einem t_A -Wert > 10 min folgt:

$$t_{v1} > t_M + X \text{ min}$$

$$X = 0\text{-}5 \text{ min Sicherheitszuschlag}$$

Grundvoraussetzung ist immer $t_M < t_A$.

Beispiel: $t_{v1} = 2$ min für 100 μ L Plasma bei 2,0 mL/min Flussrate (Abbildung 92)

6.2.1.2.6.2 Schaltzeitpunkt Transferschritt [t_{v2}]

Die Ventilschaltung zum Zeitpunkt t_{v2} beendet den Transfer des Analyten und koppelt die SPE-Säule von der analytischen Trennsäule ab (siehe Abbildung 84 A).

$$t_{v2} > t_T + X$$

$$t_{v2} = t_{v1} + t_T + 1 \text{ min}$$

$X = 0\text{-}3 \text{ min}$ Sicherheitszuschlag

Beispiel: $t_{v2} = 5 \text{ min}$ für $100 \mu\text{L}$ Humanplasma bei $2,0 \text{ mL/min}$ Flussrate (siehe Abbildung 92).

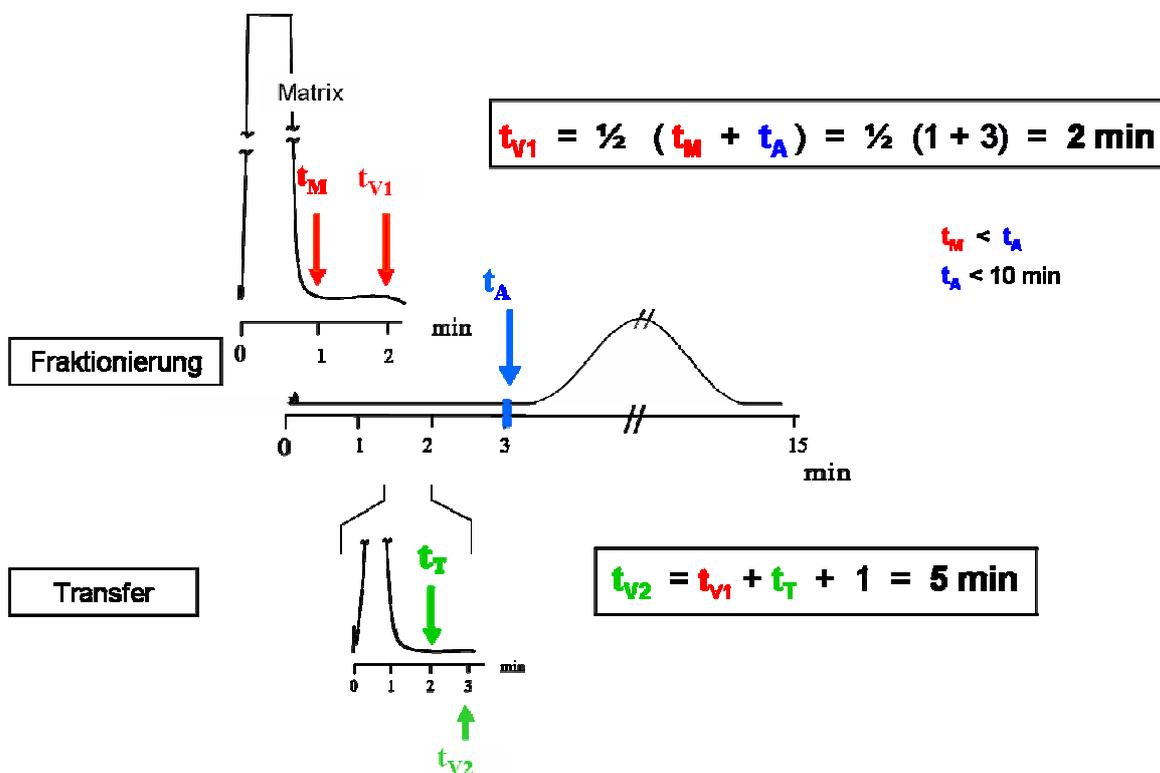


Abbildung 92: Berechnung der Ventilschaltzeiten t_{v1} und t_{v2} .

In Zusammenarbeit mit der Firma Dionex Softron GmbH wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Programm für die Chromeleon 6.80 Software geschrieben, welches dem Benutzer Schritt für Schritt anschaulich erläutert und hilft eine on-line SPE-HPLC-Methode selbst zu programmieren. Dabei errechnet die Software unter anderem

selbstständig die Ventilschaltzeiten.

6.2.1.2.6.3 Schaltzeitpunkt Heart-Cut [t_{v3}]

t_{v1} stellt neben dem Zeitpunkt der Beendigung des Fraktionierungsschrittes gleichzeitig den Beginn des „Heart-Cuts“ bzw. der Ausblendung dar. Die für die Detektion unerwünschte Mischung bzw. deren Volumenanteil wird über eine Drei-Wege-Ventilschaltung in den Abfall geleitet. Dadurch wird die analytische Säule vom Detektor für eine bestimmte Zeit abgekoppelt. Die Schaltung des Drei-Wege-Ventils zum Zeitpunkt t_{v3} beendet den Heart-Cut und koppelt die analytische Säule wieder an den Detektor.

$$t_{v3} = t_{v1} + t_{HC} + Y$$

oder

$$t_{v3} = t_{v1} + t_{R(\text{Analyt})} - Z$$

Y = 0-3 min Sicherheitszuschlag

Z = 1-3 min Sicherheitsabschlag

6.2.1.2.7 Analysenzyklus und Optimierung

Mit den Parametern, die in den vorangegangenen Arbeitsschritten ermittelt wurden, kann nun ein vollständig automatisierbarer Analysenzyklus zusammengestellt werden. Der Ablauf einer on-line Analyse gliedert sich in folgende Teilschritte:

- Probeninjektion
- Transfer
- Analytische Trennung
- und evtl. die Ausblendung der Pufferfront bzw. Phasenfront.

6.2.1.2.7.1 Probeninjektion und Fraktionierung

Die zentrifugierte Probe (z.B. Urin, Humanplasma) wird mit einem automatischen Probengeber auf die SPE-Säule aufgegeben. Hier erfolgt zunächst der Fraktionierungsschritt in Analyt- und Matrixfraktion. Die mobile Phase, die von Pumpe 1 gefördert wird, eluiert alle makromolekularen Probenbestandteile über Ventilposition 4-5 direkt in den Abfall. Gleichzeitig werden die Analyte, die aufgrund ihrer geringen Größe ungehindert die Adsorptionszentren erreichen können, an der SPE-Säule retiniert.

Dieses Ziel kann durch die Optimierung verschiedener Parameter erreicht werden:

a) Auswahl eines geeigneten SPE-Packungsmaterials

Über die Wahl des SPE-Packungsmaterials einer entsprechenden SPE-Säule können die physikalisch-chemischen bzw. chromatographischen Eigenschaften des Analyten für eine selektive Extraktion benutzt werden. Wie im Kapitel 5 beschrieben, stehen hierfür sogenannte „Restricted Access“ Packungsmaterialien zur Verfügung, die sowohl eine Umkehrphasen-, Ionenaustausch-, als auch eine Affinitätschromatographie erlauben. Es besteht daher die Möglichkeit für einen bestimmten Analyten bzw. für eine bestimmte Probenmatrix, das am Besten geeignete Packungsmaterial einzusetzen. Dadurch wird die unerwünschte Extraktion und Anreicherung von störenden Matrixkomponenten minimiert und die Selektivität der Probenaufbereitung erhöht.

b) Zusammensetzung der mobilen Phase

Die mobile Phase für die integrierte SPE Probenaufbereitung sollte so beschaffen sein, dass diese möglichst selektiv und quantitativ die Matrixbestandteile abreichert. Für den Zielanalyten hingegen sollte dieser Eluent keine oder nur eine minimale Elutionskraft aufweisen. Bei der Verwendung einer Umkehrphase als SPE-Packungsmaterial (z.B. LiChrospher®ADS) sollte dem Fließmittel generell ein entsprechender Anteil an einem organischen Modifier wie z.B. Acetonitril zugesetzt werden, um die Zielanalyten von deren Bindungsstelle an den entsprechenden Matrix-

komponenten zu verdrängen. Der Anteil an organischem Modifier sollte, insbesondere bei proteinhaltigen Proben (z.B. Humanplasma), kleiner 15 Vol. % Methanol, kleiner 10 Vol. % Acetonitril und kleiner 5 Vol. % 2-Propanol betragen, um eine Präzipitation der Proteine zu vermeiden [141].

Der pH-Wert der mobilen Phase sollte sich nach Möglichkeit im physiologischen Bereich der Probe bewegen, um biokompatible chromatographische Bedingungen zu schaffen, die eine Präzipitation makromolekularer Probenbestandteile ausschließen. Falls für die Retention bzw. Neutralisation eines geladenen Analyten ein saurer pH-Wert gewählt werden muss, z. B. für die Protonierung einer Carbonsäuregruppe, sollte die pH-Wert Einstellung vorzugsweise mit Phosphorsäure (bis pH 4,0) oder Trichloressigsäure (TCA) (bis pH 5,0) erfolgen.

6.2.1.2.7.2 Transferschritt

Nach erfolgter Probenaufbereitung und Abtrennung der störenden Matrixbestandteile wird das Sechs-Wege-Ventil automatisch in Position B (siehe Abbildung 84 B) geschaltet. Durch diesen Vorgang wird die SPE-Säule mit der analytischen Trennsäule in Serie geschaltet. Die auf der SPE-Säule adsorbierten Analyte werden unter Umkehrung der Flussrichtung (sog. „Back-Flush“ Technik) in einem Transferschritt quantitativ auf die analytische Trennsäule überführt. Die stärkere Elutionskraft der von Pumpe 2 geförderten mobilen Phase und die „Back-Flush“ Technik bewirken dabei eine schnelle Desorption und gleichzeitige Aufkonzentrierung der Analyten. Darüber hinaus kann damit eine Bandenverbreiterung der Peaks im anschließenden analytischen Chromatogramm verhindert werden.

Eine Optimierung des Transferschrittes besteht daher in der sog. in-line Anreicherung oder Peakkompression. Dabei werden die von der SPE-Säule desorbierten Analyte am Kopf der analytischen Säule in einer scharfen Bande fokussiert und so vor der eigentlichen Trennung nochmals aufkonzentriert. Dies hat eine verbesserte Analysenqualität d.h. niedrigere Nachweis- und Bestimmungs-

grenzen zur Folge. Für den Fall einer analytischen Trennung an einer Umkehrphase bedeutet dies, dass der Anteil an organischem Modifier für den Transferschritt von einer RP-SPE Säule geringer sein muss, als derjenige, der für die eigentliche Trennung benötigt wird.

Eine entsprechende Optimierung kann prinzipiell auf 3 verschiedene Art und Weisen erreicht werden:

- Änderung des pH-Werts der mobilen Phase

Durch die Änderung des pH-Werts können die Ladungseigenschaften des Analyten verändert z.B. neutralisiert werden, was zu einer Veränderung der chromatographischen Eigenschaften (Retention) und somit zu einer erleichterten Desorption führt.

- Thermotransfer

Die aus der Gaschromatographie bekannte Technik zur thermischen Desorption retenierter Analyte kann auch in der HPLC eingesetzt werden. Dieses Verfahren wurde erstmals von Lintelmann et al. [142, 143] zur Desorption von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) von einem mit Kupferphthalocyanin-modifizierten Kieselgel eingesetzt. Bei dieser Technik wird die wässrige mobile Phase im Transferschritt unter Druck sehr stark erwärmt (bis zu 100 °C). Bei diesen Temperaturen nimmt die wässrige Lösung einen „subkritischen“ Zustand ein [144]. Dies führt zu einer signifikanten Abschwächung der Polarität und somit der Elutionskraft. Neben der Polarität werden auch die Oberflächenspannung und die Viskosität des Wassers reduziert. Die Erwärmung der für den Transferschritt verwendeten mobilen Phase wird durch das Anlegen einer elektrischen Spannung an die Kapillarverbindung zwischen der Position 4 des Schaltventils und der SPE-Säule erreicht. Dabei dient die Metallkapillare als Ohm'scher Widerstand (siehe Abbildung 93). Die erzielte Temperaturerhöhung ist der angelegten Spannung direkt proportional. Die kurzzeitige Erhitzung der für den Transferschritt benötigten mobilen Phase, erlaubt es daher, den Anteil an organischem Modifier um bis zu ca.

50 % zu erniedrigen. Der Thermo-Transfer ermöglicht es daher auch sehr apolare Analyte in einem geringen Elutionsvolumen, d.h. ohne Peakverbreiterung, von der SPE-Säule auf die analytische Säule zu transferieren.

- In-line Verdünnung

Für apolare Substanzen, die auf einer RP-SPE Säule stark retiniert und somit nur in einem großen Volumen bzw. mit einem Eluenten, der einen hohen Anteil an organischem Modifier aufweist und damit eine Umkehrphasentrennung erschwert, wenn nicht sogar ausschließt, kann mit Hilfe einer sog. „in-line Verdünnung“ dieses Problem gelöst werden. Zu diesem Zweck wird ein totvolumenfreies T-Stück in die Kapillarverbindung zwischen SPE-Säule und analytischer Säule eingebaut. Durch Zumischen eines entsprechenden Anteils an Wasser mittels einer dritten Pumpe zum Transfer-Eluat der SPE-Säule kann dessen Anteil an organischem Modifier auf den für die analytische Trennung geeigneten Anteil eingestellt werden (siehe Abbildung 93).

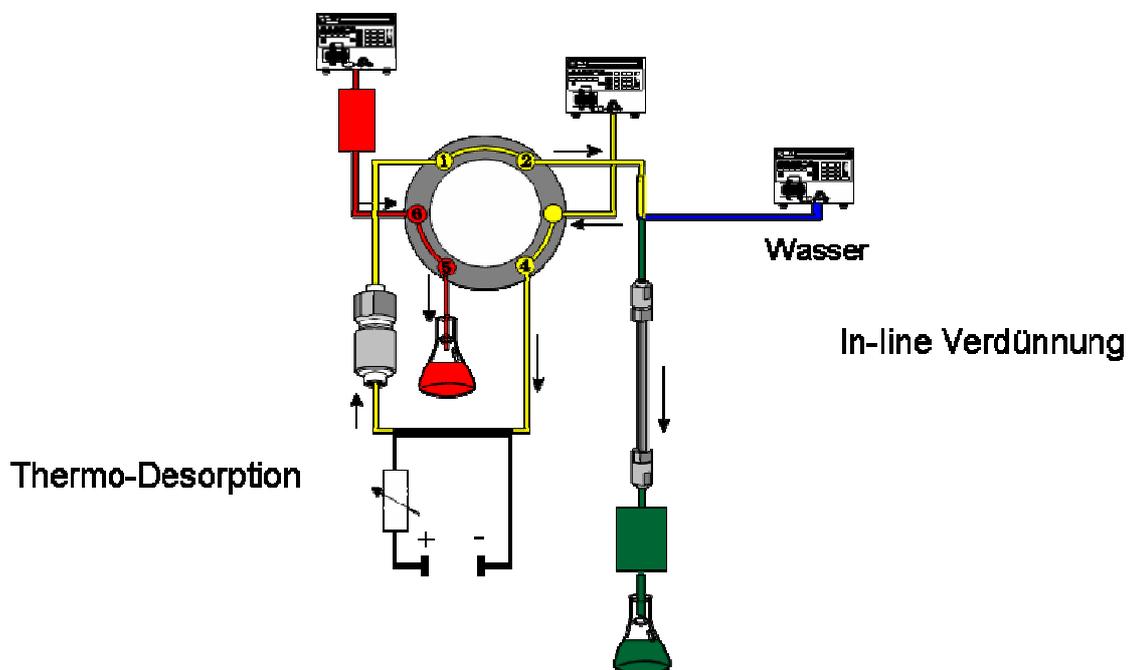


Abbildung 93: Optimierung des Transferschritts durch Thermo-Desorption oder In-line Verdünnung

6.2.1.2.7.3 Analytische Trennung

Nach dem vollständigen Transfer der Analytfraktion auf die analytische Trennsäule wird das Ventil wieder in die Ausgangsposition A zurückgeschaltet (siehe Abbildung 84 A). Nun erfolgt in konventioneller Weise die chromatographische Trennung der 4 Modellanalyte (siehe Abbildung 94). Simultan zur Trennung wird die SPE-Säule wieder mit dem Fließmittel für den Fraktionierungsschritt reäquilibriert. Anschließend kann - simultan zur analytischen Trennung - eine neue Probe injiziert und aufbereitet werden.

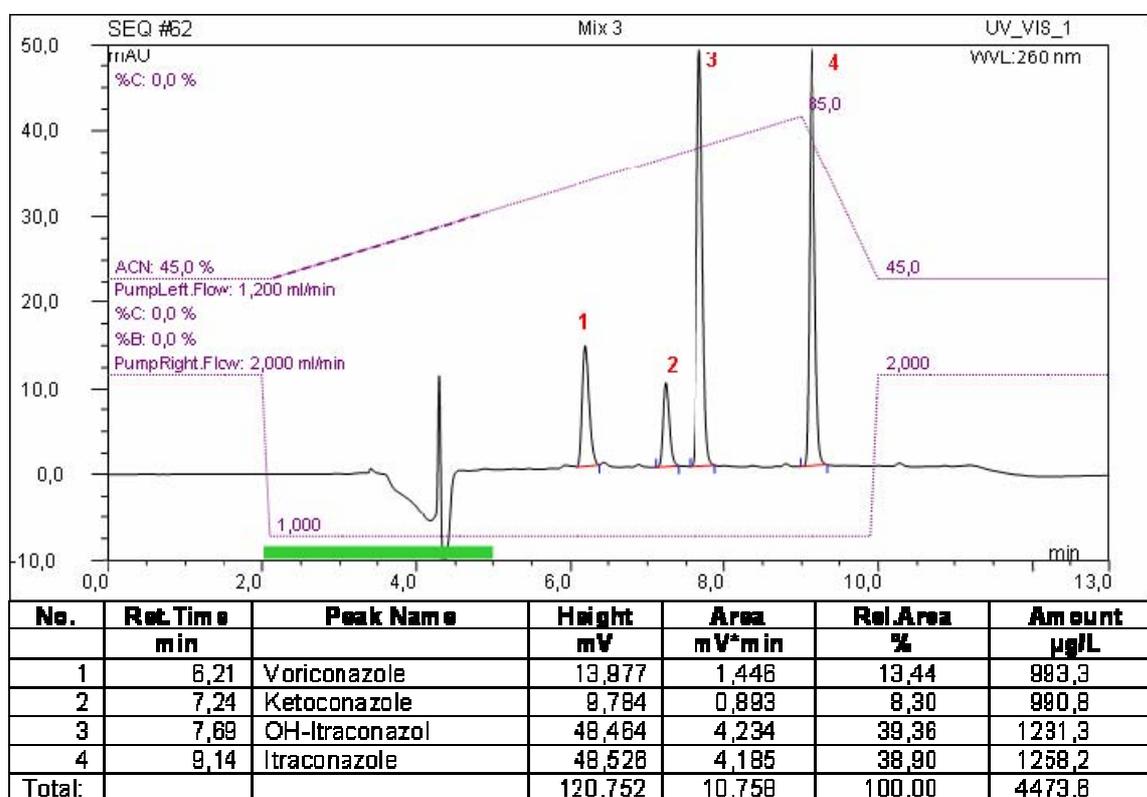


Abbildung 94: Chromatogramm einer on-line SPE-HPLC-UV Analyse der Modellanalyte (Antimykotika), SPE-Säule: LiChrospher® RP4 ADS, 25x4 mm ID, 25µm; HPLC-Säule: Dionex Acclaim™ 120 C8, 3µm, 120 Å, 4.6 x 150 mm ID, 40°C; Mobile Phase (Fraktionierung): Wasser/Acetonitril (98/2, v/v); Flussrate: 2,0 mL/min; Mobile Phase (Transfer): Ammoniumacetat (0.01M) / Acetonitril (Gradient); Flussrate: 1,2 mL/min; Probe: Standardmischung; Injektionsvolumen: 100 µL; Detektion: UV; λ=260 nm.

6.2.1.2.7.4 Memory-Effekt

Der Modellanalyt Itraconazol führt – beispielhaft – aufgrund seiner sehr apolaren Eigenschaften zu einem sogenannten Memory-Effekt. Die zuvor beschriebenen chromatographischen Bedingungen führen in diesem Fall dazu, dass der Analyt Itraconazol nicht vollständig von der SPE-Säule auf die analytische Trennsäule transferiert wird. Dies wurde wie in Abbildung 95 gezeigt, dadurch überprüft, dass nach der Injektion der entsprechenden Standardlösung die Analyse einer Probe von destilliertem Wasser erfolgte.

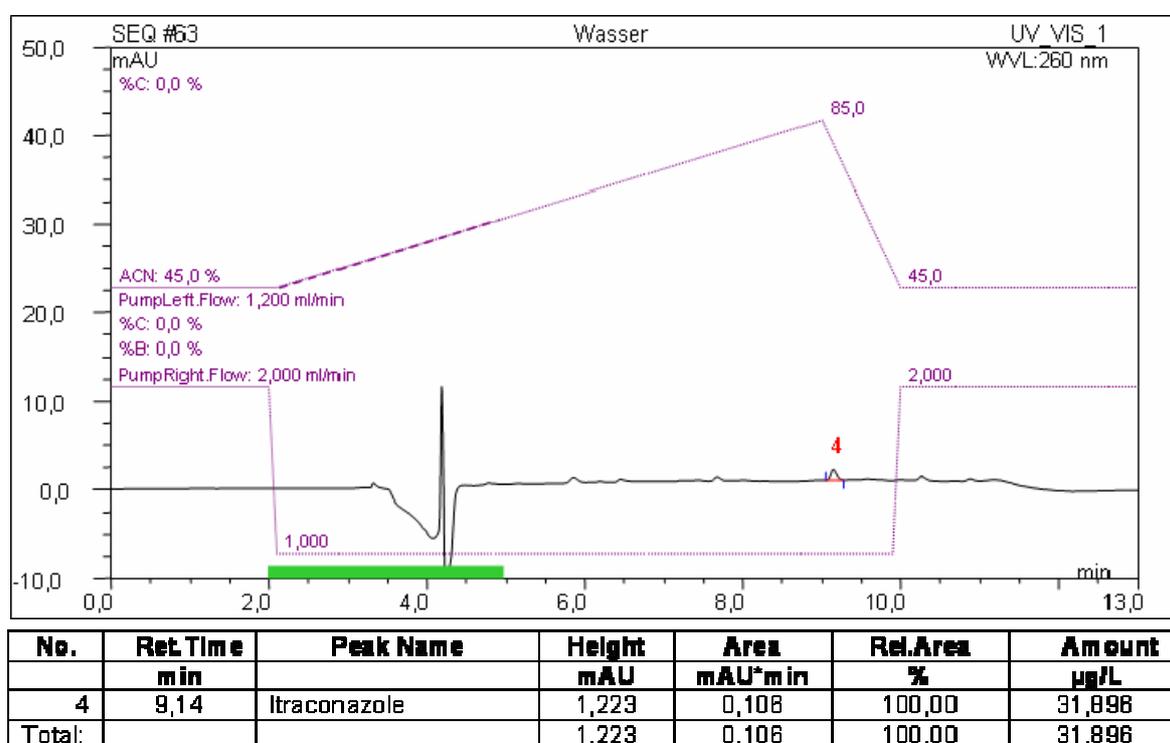


Abbildung 95: Memory-Effekt: On-line SPE-HPLC Analyse von destilliertem Wasser nach vorheriger Injektion einer Standardlösung des Modellanalyten Itraconazol. SPE-Säule: LiChrospher® RP4 ADS, 25x4 mm ID, 25µm; HPLC-Säule: Dionex Acclaim™ 120 C8, 3µm, 120 Å, 4.6 x 150 mm ID, 40°C; Mobile Phase (Fraktionierung): Wasser/Acetonitril (98/2, v/v); Flussrate: 2,0 mL/min; Mobile Phase (Transfer): Ammoniumacetat (0.01M) / Acetonitril (Gradient); Flussrate: 1,2 mL/min; Probe: HPLC-Wasser; Injektionsvolumen: 100 µL; Detektion: UV; λ=260 nm.

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten um derartige Memory-Effekte zu eliminieren:

- 1) Verlängerung der Transferzeit von der SPE-Säule auf die analytische Trennsäule
- 2) Extensive Regenerierung der SPE-Säule

(siehe Abbildung 96).

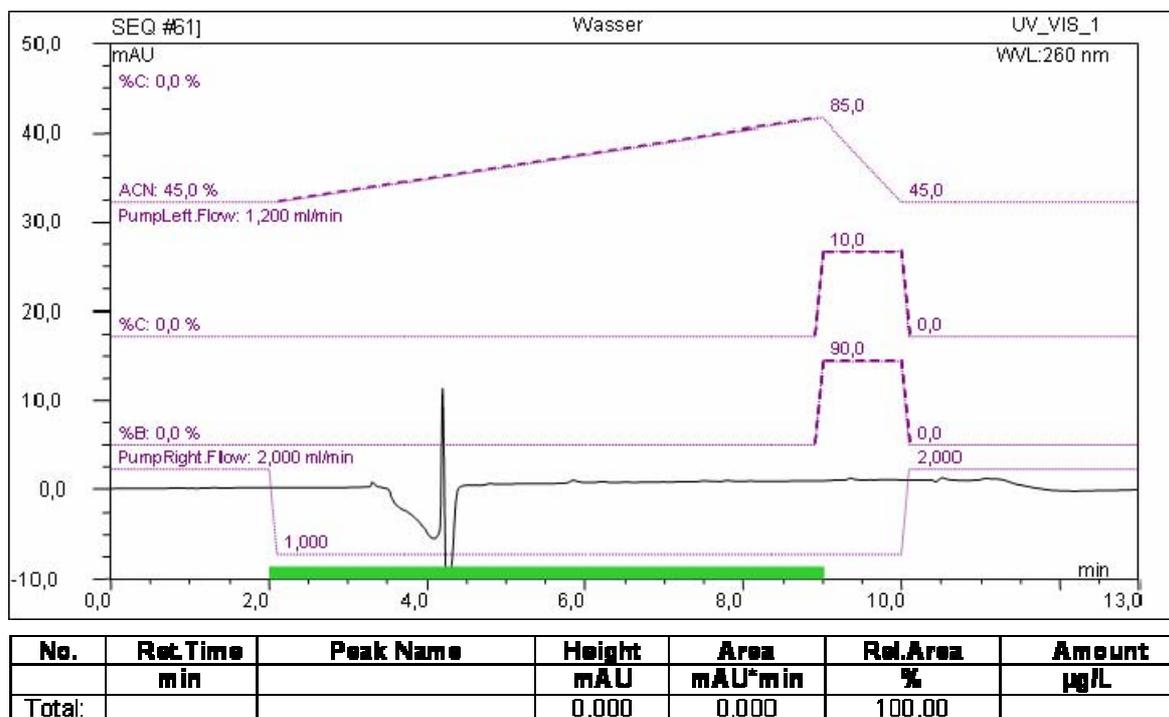
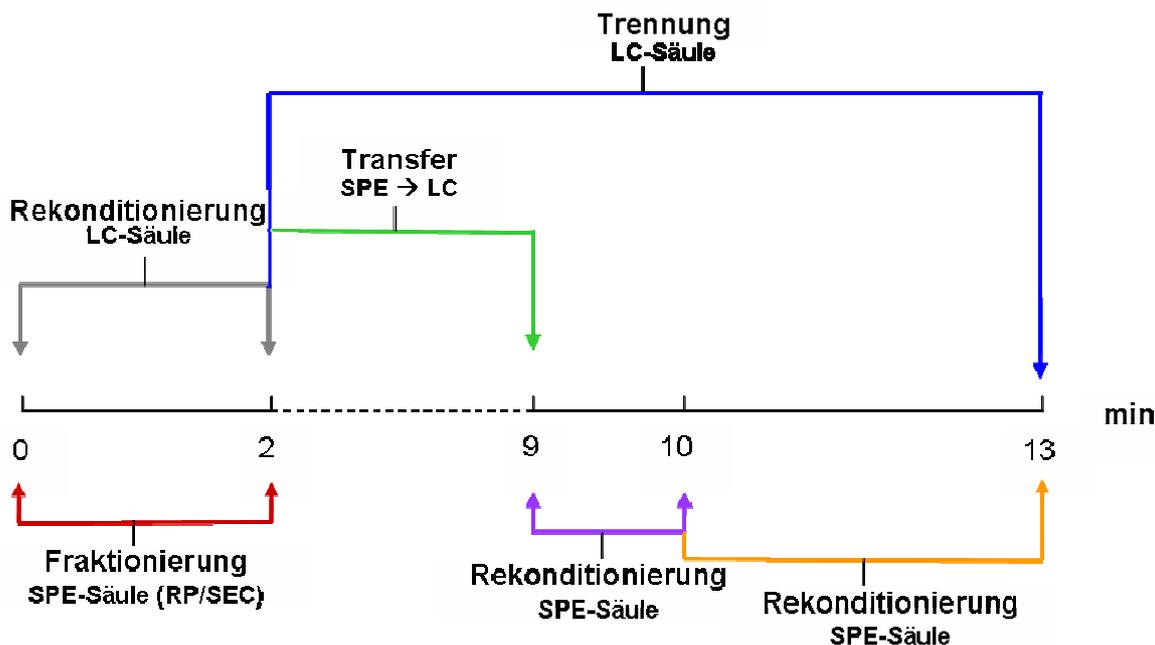


Abbildung 96: Memory-Effekt: On-line SPE-HPLC Analyse von destilliertem Wasser nach vorheriger Injektion einer Standardlösung des Modellanalyten Itraconazol und nachfolgender Regenerierung und Äquilibration der SPE-Säule. SPE-Säule: LiChrospher® RP4 ADS, 25x4 mm ID, 25µm; HPLC-Säule: Dionex Acclaim™ 120 C8, 3µm, 120 Å, 4.6 x 150 mm ID, 40°C; Mobile Phase (Fraktionierung): Wasser/Acetonitril (98/2, v/v); Flussrate: 2,0 mL/min; Mobile Phase (Transfer): Ammoniumacetat (0.01M) / Acetonitril (Gradient); Flussrate: 1,2 mL/min; Mobile Phase (Regenerierung der SPE-Säule): Wasser/Acetonitril (10/90, v/v); Flussrate: 2,0 mL/min; Probe: HPLC-Wasser; Injektionsvolumen: 100 µL; Detektion: UV; λ=260 nm.

Abbildung 97 zeigt das ausgearbeitete Schaltschema bzw. Verfahrensprotokoll für die on-line SPE-HPLC-UV-Analyse der Modellanalyten in einer biologischen Flüssigkeit.



- **SPE-Säule** : LiChrospher® RP4 ADS, 25 x 4 mm ID, 25µm, VWR Intl.
- **Analytische Säule** : Dionex Acclaim™ 120 C8, 3µm , 120 Å, 4,6 x 150 mm ID
- **Mobile Phase SPE-Säule (Fraktionierung/Rekonditionierung)** :
Wasser / Acetonitril (98/2, v/v); Flussrate: 2 mL/min
- **Mobile Phase LC- Säule (Transfer/Trennung/Rekonditionierung)** :
0,01 M NH₄-acetat / Acetonitril (Gradient); Flussrate: 1,2 mL/min; 40°C
- **Mobile Phase SPE-Säule (Rekonditionierung)** :
Wasser / Acetonitril (10/90, v/v); Flussrate : 2 mL/min
- **Injektionsvolumen** : 100 µL
- **UV Detektion**: λ 260 nm

Abbildung 97: Analyseschema für die on-line SPE-HPLC-UV Bestimmung der Modellanalyten Voriconazol, Ketoconazol, Itraconazol und 1-OH-Itraconazol

Dieses Analyseschema wurde erfolgreich für die Quantifizierung von Patientenproben angewendet. Das Chromatogramm in Abbildung 98 zeigt beispielhaft eine Patientenprobe. Beide Analyten, d.h. Itraconazol und dessen Metabolit 1-OH-Itraconazol konnten direkt aus nativem Plasma in weniger als 10 Minuten quantifiziert werden.

Das zweite Beispiel (siehe Abbildung 99) zeigt die Analyse einer Plasmaprobe eines Patienten, welcher von Itraconazol auf Voriconazol umgestellt wurde.

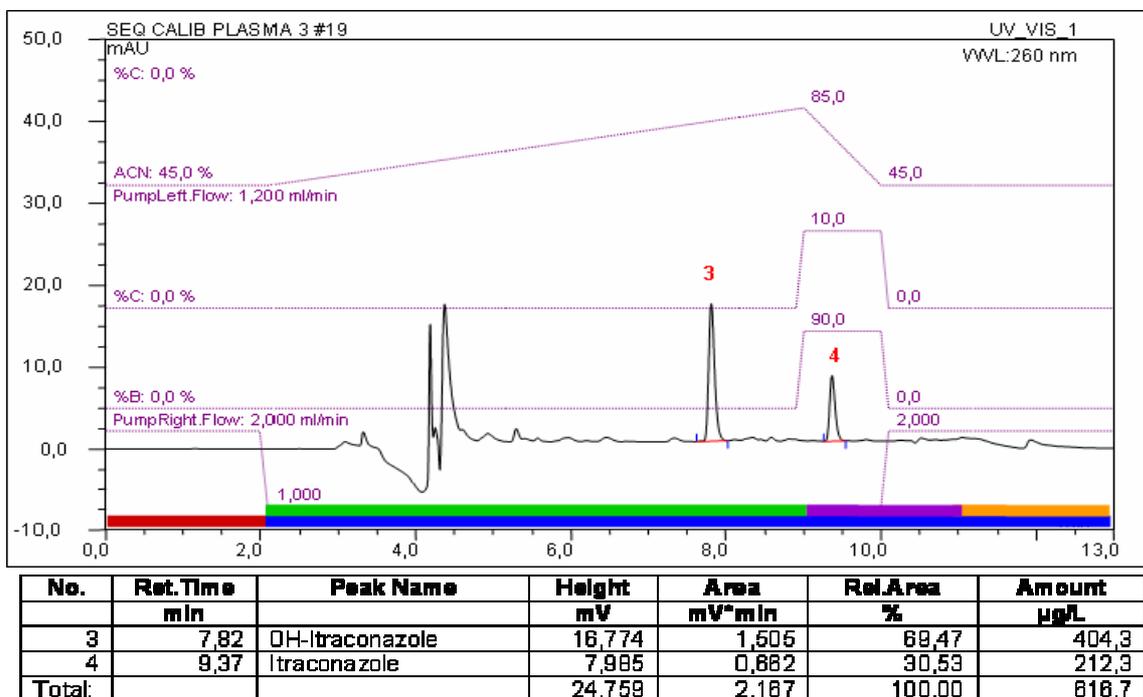


Abbildung 98: On-line SPE-HPLC-UV Bestimmung von Itraconazol und 1-OH-Itraconazol in 100 µL einer Plasmaprobe eines Patienten.

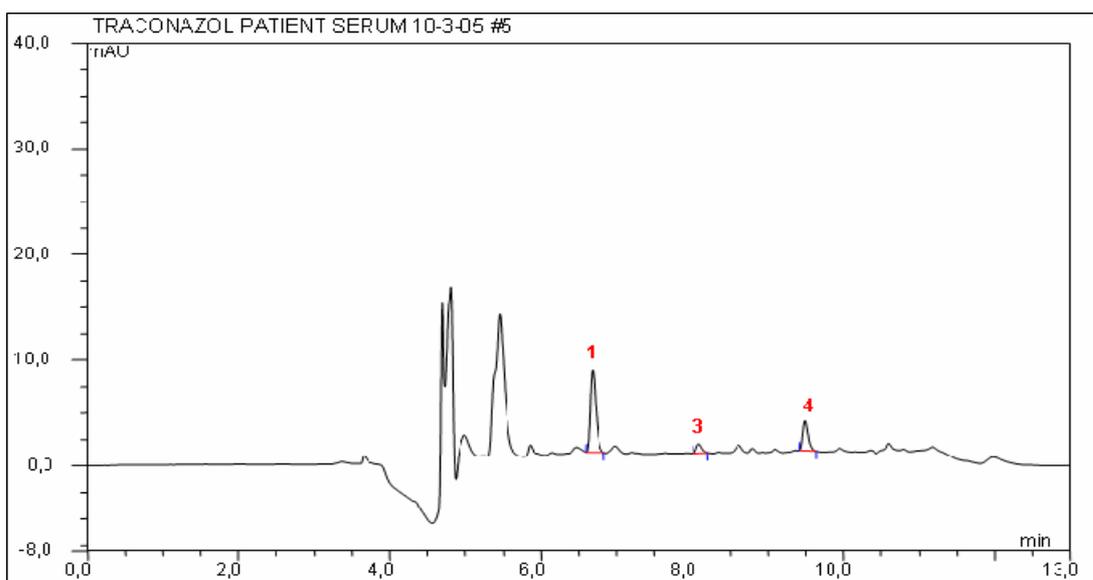


Abbildung 99: On-line SPE-HPLC-UV Bestimmung von Voriconazol, Itraconazol und 1-OH-Itraconazol in 100 µL einer Plasmaprobe eines Patienten.

Wie in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt wurde, ist es möglich die methodische Entwicklung und den komplexen Ablauf einer HPLC-integrierten Festphasenextraktion zu standardisieren. Nach experimenteller Ermittlung der drei bzw. 4 Parameter (t_A , t_M , t_T , t_{HC}) und die sich daraus ergebenden Ventilschaltzeiten (t_{V1} , t_{V2} und evtl. t_{V3}), lässt sich auf einfache Weise ein Analysenzyklus zusammenstellen (siehe Abbildung 100). Darüber hinaus bestehen vielfältige Möglichkeiten, die einzelnen Analyseschritte auf den jeweiligen Analyten oder die jeweilige biologische Probe hin zu optimieren.

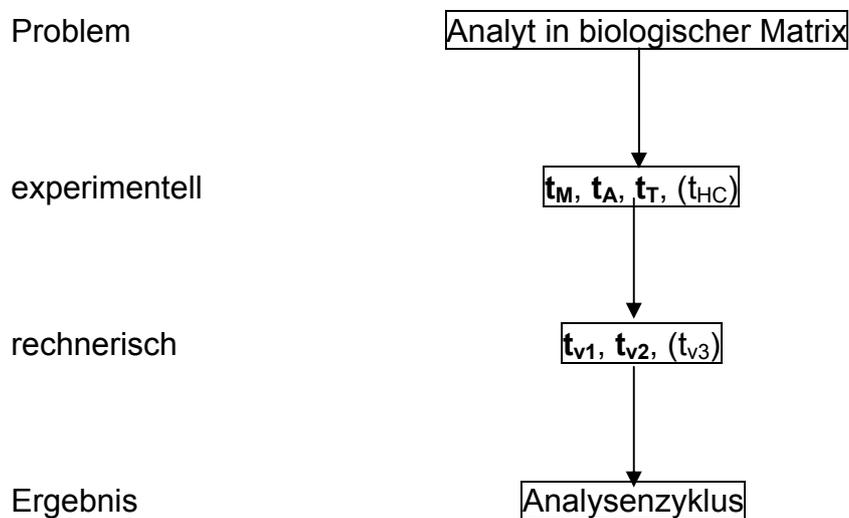


Abbildung 100: Vorgehensweise bei der Methodenentwicklung

6.2.2 Entwicklung einer on-line SPE-HPLC-ECD Methode zur Bestimmung von Katechol- aminen in Humanurin

Wie im Kapitel 5 erläutert, können die Katecholamine im Urin sehr selektiv und sensitiv mittels elektrochemischer Detektion bestimmt werden. Bislang war diese Detektionsmethode jedoch nur nach einer off-line Aufbereitung und Injektion der aufgereinigten Probe in ein HPLC-ECD System möglich.

Der Grund hierfür liegt darin, dass es bei einer konventionellen on-line Kopplung einer SPE-Säule mit einem HPLC-ECD System – infolge der Mischung zweier mobiler Phasen – zu einer ausgeprägten Störung des Detektorsignals und somit der Basislinie kommt. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es erstmalig dieses Problem zu lösen. Hierzu wurde – wie zuvor beschrieben – eine sogenannte „Heart-Cut“ Schalttechnik verwendet.

6.2.2.1.1 Funktionsweise der RAM SPE-Säule

Für die hochselektive Extraktion und adsorptive Anreicherung der Katecholamine aus der komplexen Urinmatrix wurde eine spezielle SPE-Säule mit Restricted Access Eigenschaften (RAM) eingesetzt. Die Topochemie und die chromatographischen Eigenschaften von RAM-Säulen sind in Kapitel 4.4.2 beschrieben. Das Packungsmaterial dieser SPE-Säule CAT-PBA entspricht dem RAM Typ A, d.h. innerhalb und ausserhalb der Poren ist derselbe Ligand an dem Trägermaterial immobilisiert. Das Basismaterial der CAT-PBA SPE-Säule ist ein hydrophiles poröses Copolymer, welches eine Ausschlussgrenze von 10 kDalton besitzt. An diesem Trägermaterial ist der Affinitätsligand Nitrophenylboronsäure immobilisiert (siehe Abbildung 101). Der mittlere Porendurchmesser des

sphärischen Copolymers beträgt 5 nm und die Partikelgröße 25 bis 50 μm .

Die SPE-basierte Aufbereitung einer Urinprobe beruht somit auf der simultanen Durchführung zweier chromatographischer Trennprozesse.

1. Sterische Ausschlusschromatographie: Makromolekulare Probenkomponenten (z.B. Proteine, Nukleinsäuren, Polysaccharide) werden mit dem Totvolumen der Vorsäule direkt in den Abfall geleitet.
2. Affinitätschromatographie: Niedermolekulare Analyte, d.h. die Katecholamine, werden hochselektiv gebunden.

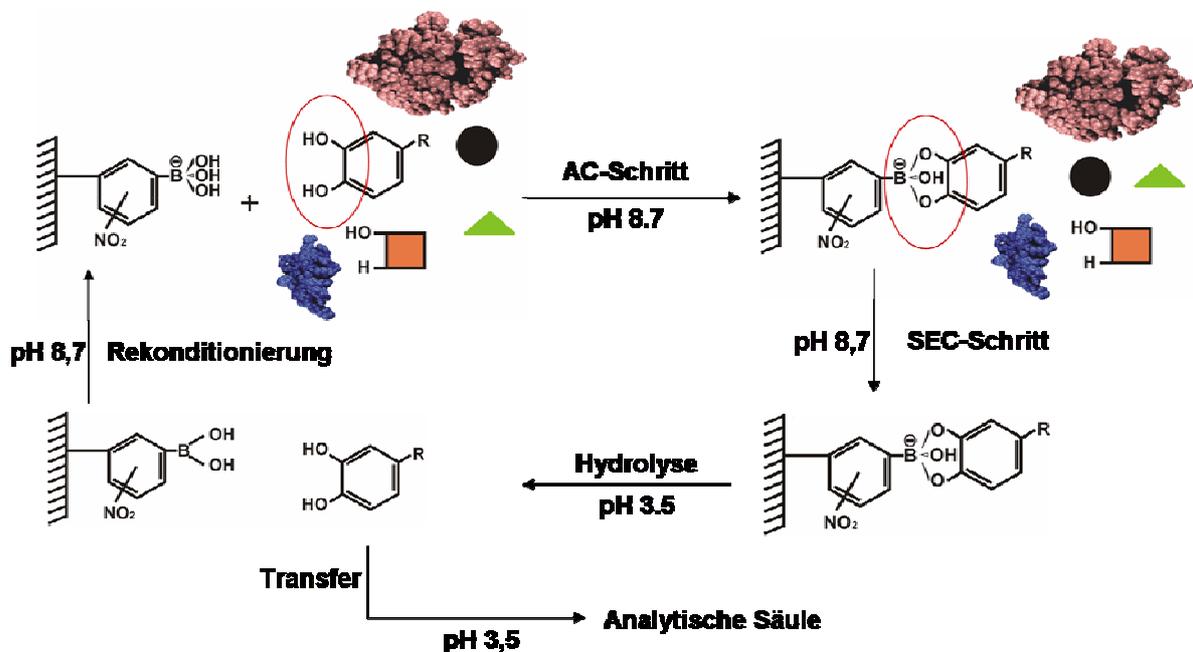


Abbildung 101: Funktionsweise der affinitätschromatographischen (AC) und größenausschlusschromatographischen (SEC) on-line Festphasenextraktion (SPE) von cis-Diol Verbindungen. Erläuterungen siehe Text.

Die vollständige on-line Aufbereitung einer unbehandelten Urinprobe erfolgt in 5 Schritten:

1. Nach Injektion der unbehandelten Urinprobe über einen automatischen Probengeber, erfolgt unter alkalischen Bedingungen eine kovalente, cyclische Esterbildung zwischen der cis-Diol Funktion der Zielanalyten (Katecholamine) und des Boronsäurerestes des Affinitätsliganden. Diese Komplexbildung ist chemoselektiv.
2. Gleichzeitig hierzu erfolgt die Abtrennung der hochmolekularen Matrixbestandteile über die Größenausschlusschromatographie.
3. Dieser Fraktionierungsschritt wird dadurch beendet, dass unter sauren Bedingungen eine Hydrolyse des zyklischen Esters zwischen Analyt und Ligand erfolgt.
4. Die freigesetzten Zielanalyten werden sodann auf die nachgeschaltete analytische Trennsäule transferiert.
5. Im letzten Zyklusschritt wird die, im sauren coplanare, trigonal vorliegende Boronatgruppe des Affinitätsliganden, unter Verwendung einer alkalischen mobilen Phase wieder in die anionische, tetragonale Konfiguration überführt.

Die verwendete CAT-PBA SPE-Säule erlaubt es, diesen on-line Zyklus mehrere 1000-mal zu durchlaufen.

Die Verwendung dieser CAT-PBA Säule wurde auch für die on-line Bestimmung der Katecholamine mittels HPLC und fluorimetrischer Detektion beschrieben [176, 177].

6.2.2.2 Systemaufbau

Abbildung 102 zeigt schematisch den Aufbau des on-line SPE-HPLC-ECD Systems. In Kapitel 8.1 sind die verwendeten Komponenten detailliert aufgelistet. Ein Analysenzyklus setzt sich wie folgt zusammen:

Schritt A:

Die native Urinprobe wird durch den automatischen Probengeber mit Hilfe der mobilen Phase (pH 8,7) der Pumpe A auf die CAT-PBA Säule injiziert. Die untersuchten Katecholamine werden chemoselektiv extrahiert und angereichert. Simultan hierzu wird die restliche Urinmatrix mit dem Totvolumen der SPE-Säule in den Abfall eluiert. Zeitgleich wird über die Pumpe B die analytische Säule mit der mobilen Phase (pH 3,5) äquilibriert und die elektrochemische Zelle im Gleichgewicht gehalten. Durch den permanenten, gleichmäßigen Fluss der mobilen Phase wird die Basislinie (Redox-Gleichgewicht) konstant gehalten (Abbildung 102).

Schritt B:

Die Ventile 4 und 12 (Abbildung 103) werden in die entsprechende Schaltstellung gebracht. Die auf der SPE-Säule angereicherten Zielanalyte werden nun mit der mobilen Phase (pH 3,5) – gefördert von Pumpe B – unter Umkehrung der Flussrichtung auf die analytische Säule transferiert. Ein bestimmter Volumenanteil des Eluats der analytischen Säule wird über das entsprechend geschaltete Drei-Wege-Ventil direkt in den Abfall geleitet. Durch diesen „Heart-Cut“ wird die störende Volumenfraktion vor dem elektrochemischen Detektor ausgeblendet. Die mobile Phase (pH 8,7) kann nach Rückführung in das Vorratsgefäß wiederverwendet werden (Abbildung 103).

Schritt C:

Das 6-Wege-Ventil wird zurück geschaltet (Ventil 4 in Abbildung 102) und die SPE-Säule wird mit der mobilen Phase (pH 8,7) reäquilibriert. Zeitgleich beginnt die chromatographische Auftrennung der Katecholamine auf der analytischen Säule. Die Ausblendung (Heart-Cut) der mobilen Phase (pH 3,5) vor der elektrochemischen Zelle kann bis kurz vor der Elution der Katecholamine aus der analytischen Säule andauern (Abbildung 104).

Schritt D:

Die SPE-Säule ist bereits für die nächste Probeninjektion konditioniert. Da der analytische Lauf noch nicht beendet ist, wird das 3-Wege-Ventil (Ventil 6 in Abbildung 102) zurückgeschaltet und damit die mobile Phase (pH 8,7) in den Kreislauf zurückgeführt. Nach dem Zurückschalten des 3-Wege-Ventils (Nummer 12 in Abbildung 102) erfolgt die Detektion der getrennten Katecholamine. Das entsprechende Eluat wird über das 3-Wege-Ventil (Nummer 15 in Abbildung 105) in den Abfall geleitet (Abbildung 105).

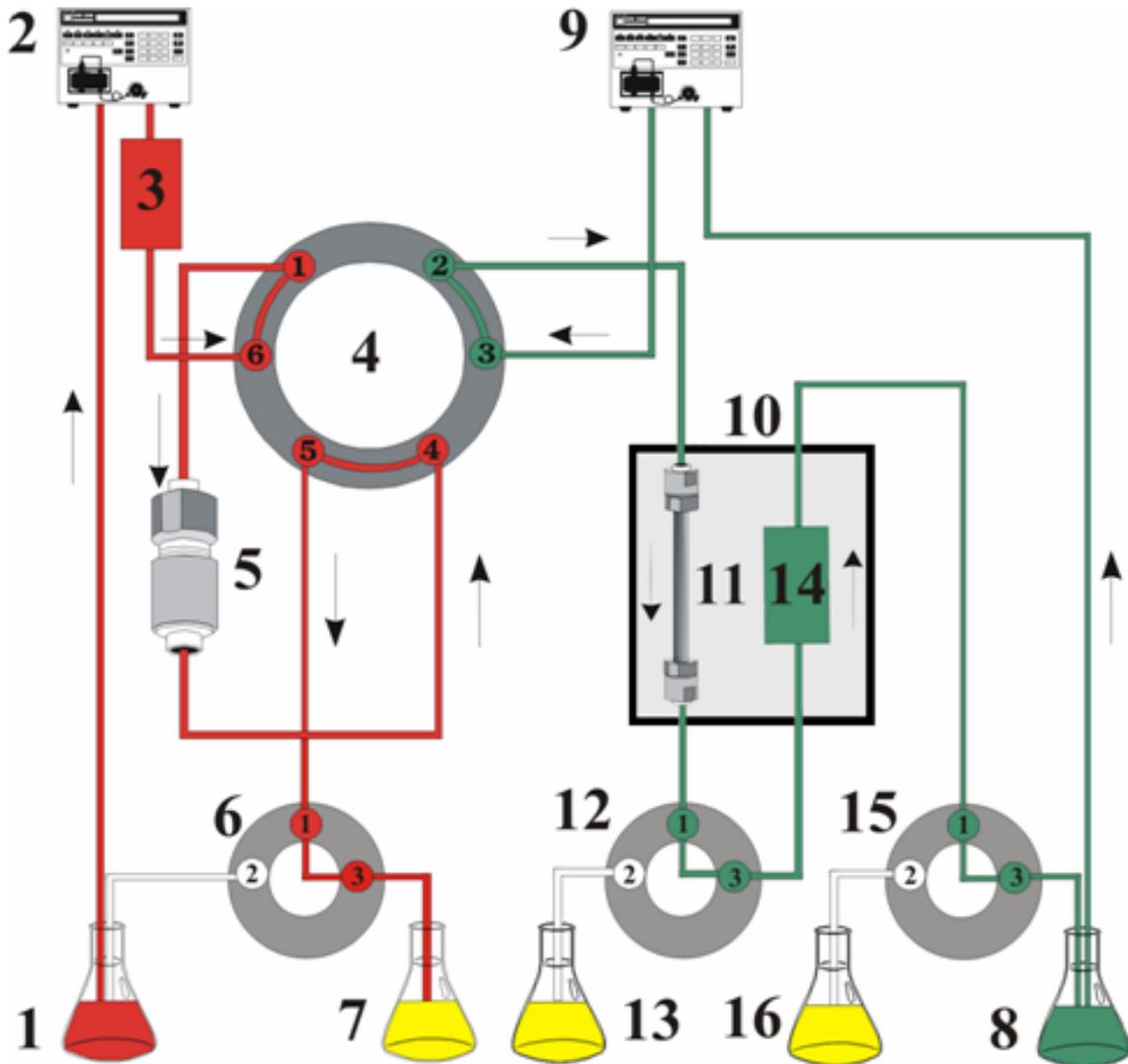


Abbildung 102: Instrumenteller Aufbau des on-line SPE-HPLC-ECD Systems: A) Fraktionierung der Probe bzw. Anreicherung der Katecholamine auf der SPE-Säule (rot); Äquilibration der analytischen Säule und der Detektorzelle sowie Recycling der mobilen Phase (grün). 1. Mobile Phase (Fraktionierung); 2. Isokratische Pumpe A; 3. Automatischer Probengeber; 4. Hochdruckschaltventil (6-Wege); 5. SPE-Säule; 6. Niederdruckschaltventil (3-Wege); 7. Abfallbehälter; 8. Mobile Phase (Trennung); 9. Isokratische Pumpe B; 10. Thermostat; 11. Analytische Trennsäule; 12. Niederdruckschaltventil (3-Wege); 13. Abfallbehälter; 14. Elektrochemische Zelle; 15. Niederdruckschaltventil (3-Wege); 16. Abfallbehälter

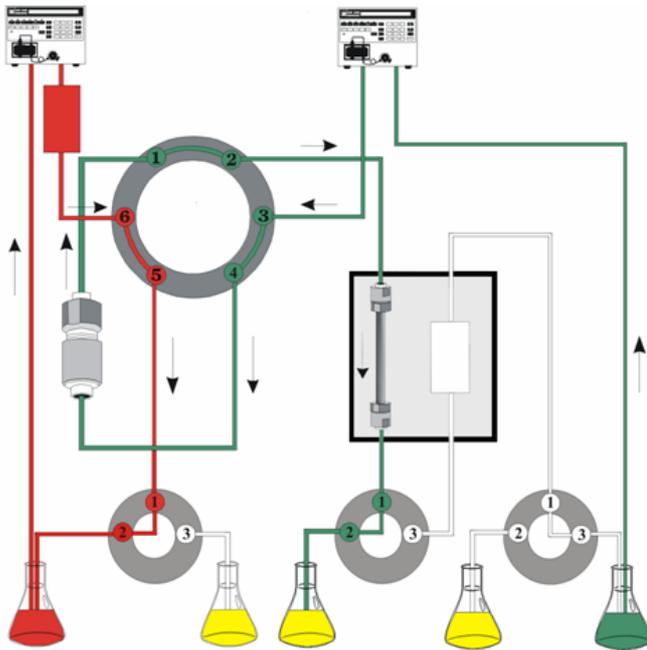


Abbildung 103: Instrumenteller Aufbau des on-line SPE-HPLC-ECD Systems: B) Wiederverwendung bzw. Recycling der mobilen Phase für die Fraktionierung (rot); Transfer de Katecholamine (grün) auf die analytische Säule; Ausblendung (Heart-Cut) der mobilen Phase vor der elektrochemischen Zelle (weiß).

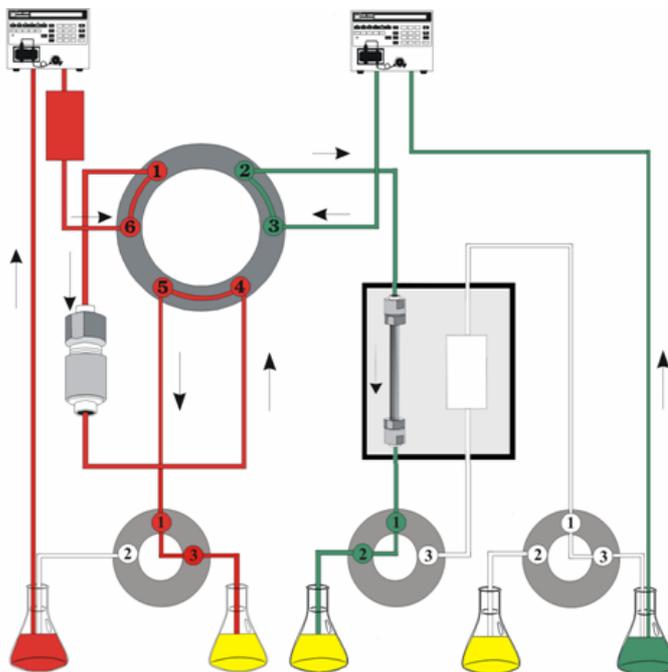


Abbildung 104: Instrumenteller Aufbau des on-line SPE-HPLC-ECD Systems: C) Reäquilibration der SPE-Säule (rot). Trennung der Katecholamine auf der analytischen Säule (grün); Ausblendung (Heart-Cut) der mobilen Phase vor der elektrochemischen Zelle (weiß).

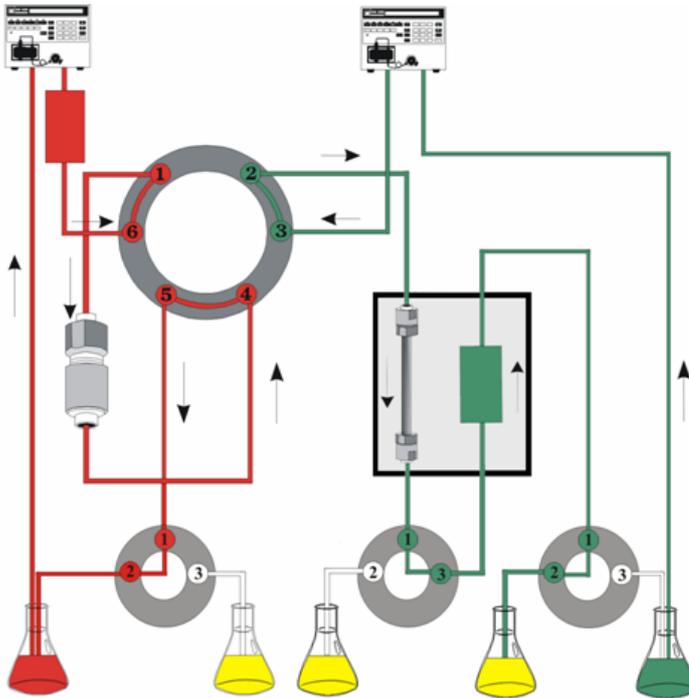


Abbildung 105: Instrumenteller Aufbau des on-line SPE-HPLC-ECD Systems:
 D) Reäquilibration der SPE-Säule (rot). Recycling der mobilen Phase; analytische Trennung und Detektion der Katecholamine (grün).

6.2.2.3 Abtrennung der Urinmatrix (t_M)

Die Bestimmung des Parameters t_M wurde, wie im Kapitel 6.2.1.2.2 beschrieben, ermittelt. Eine entsprechende Urinprobe wird über das Injektionsventil auf die konditionierte SPE-Säule injiziert. Das resultierende Elutionsprofil wird bei einer Flussrate von 2 mL/min mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 254 nm aufgenommen.

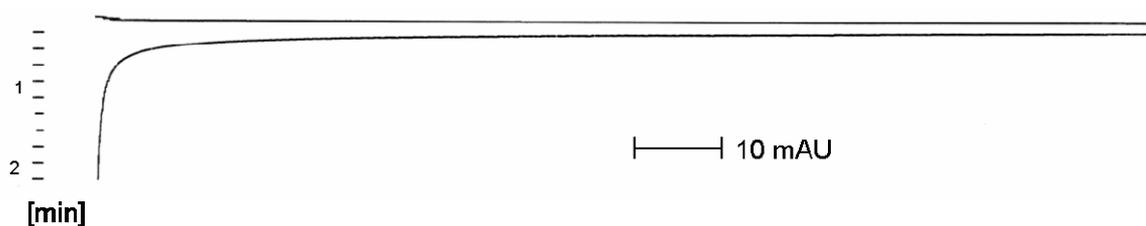


Abbildung 106: Bestimmung des Parameters t_M : a) Probe: 25 μ l Urin dotiert mit Noradrenalin (2000 μ g/L) b) Fraktionierung: SPE-Säule CAT-PBA, 30 x 4 mm ID; Mobile Phase: 0,2M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 10mM EDTA, Methanol 5% (v/v), pH 8,7; c) Flussrate: 2 mL/min d) UV-Detektion: 254 nm

Wie aus der Abbildung 106 hervorgeht wird die Probenmatrix (25 μ L Urin) innerhalb von 1 Minute d.h. in einem Volumen von 2 mL vollständig von der SPE-Säule eluiert.

6.2.2.4 Elutionsprofil der untersuchten Katecholamine (t_A)

Zur Bestimmung des Parameters t_A wird – wie im Kapitel 6.2.1.2.3 beschrieben – vorgegangen. Eine wässrige Standardprobe wird über das Injektionsventil auf die konditionierte SPE-Säule injiziert. Das resultierende Elutionsprofil wird bei einer Flussrate von 2 mL/min mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 254 nm aufgenommen.

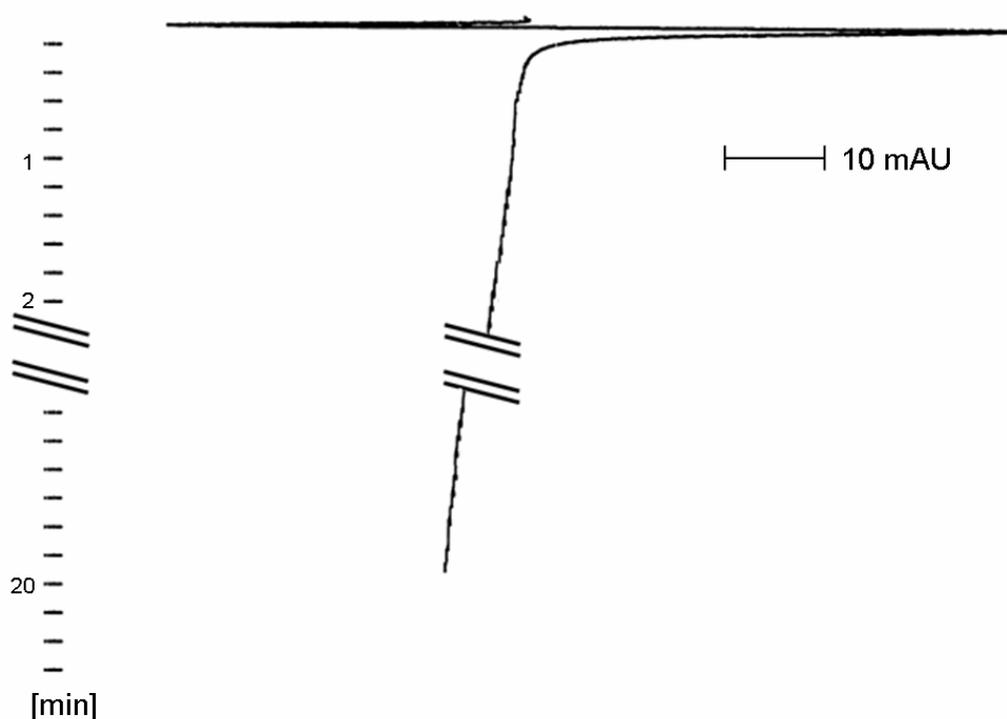


Abbildung 107: Bestimmung des Parameters t_A : a) Probe: 25 μ l Wasser dotiert mit Noradrenalin (2000 μ g/L) b) Fraktionierung: SPE-Säule CAT-PBA, 30 x 4 mm ID; Mobile Phase: 0,2M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 10mM EDTA, Methanol 5% (v/v), pH 8,7; c) Flussrate: 2 mL/min d) UV-Detektion: 254 nm

Wie aus dem Chromatogramm (Abbildung 107) ersichtlich ist wird – wie erwartet – auch nach 20 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min Noradrenalin nicht von der SPE-Säule eluiert. Der Grund hierfür ist die chemoselektive, kovalente Bindung von Noradrenalin an das affinitätschromatographische SPE-Adsorbermaterial.

6.2.2.5 Transfer der untersuchten Katecholamine (t_T)

Zur Bestimmung des Parameters t_T wird – wie im Kapitel 6.2.1.2.4 beschrieben – vorgegangen. Eine entsprechende Urinprobe wird über das Injektionsventil auf die konditionierte SPE-Säule injiziert und 2 Minuten lang fraktioniert. Anschließend wird das System – nach Entfernung der SPE-Säule – mit der mobilen Phase (pH 3,5) gespült. Danach wird die SPE-Säule unter Umkehrung der Flussrichtung wieder eingebaut und das Elutionsprofil des dotierten Noradrenalins bei einer Flussrate von 2 mL/min mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 254 nm aufgenommen.

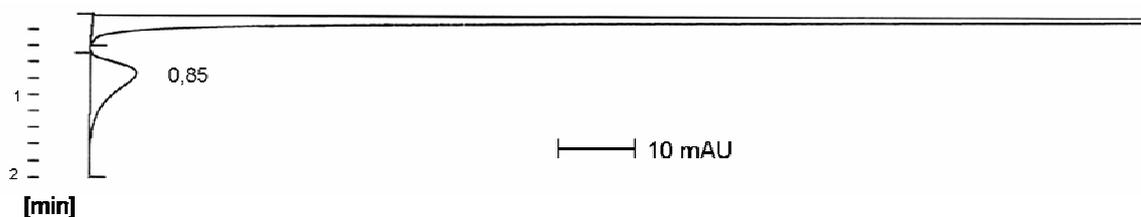


Abbildung 108: Bestimmung des Parameters t_T : a) Probe: 25 μ l Urin dotiert mit Noradrenalin (2000 μ g/L) b) Fraktionierung: SPE-Säule CAT-PBA, 30 x 4 mm ID; Mobile Phase: 0,2M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 10mM EDTA, Methanol 5% (v/v), pH=8,7 c) Transfer: Mobile Phase: 50mM KH_2PO_4 , 0,27mM EDTA, 10mM KCl, 2,5mM Natrium-octylsulfonat, ACN 4% (v/v), pH 3,5; d) Flussrate: 2 mL/min e) UV-Detektion: 254 nm

Wie aus dem in Abbildung 108 gezeigten Elutionsprofil hervorgeht wird der Zielanalyt Noradrenalin innerhalb von 0,8 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min von der SPE-Säule auf die analytische Trennsäule transferiert. Der Peak mit einer Retentionszeit von 0,12 Minuten ist ein Schaltpeak und systembedingt. Die daraus resultierende Transferzeit (siehe auch Kapitel 6.2.1.2.4) beträgt somit 1,6 min.

6.2.2.6 Temporäre Ausblendung der mobilen Phase (t_{HC})

Zur Bestimmung des Parameters t_{HC} wird – wie im Kapitel 6.2.1.2.5.1 beschrieben – vorgegangen. Eine Probe des ersteluerenden Analyten Noradrenalin wird auf die SPE-Säule injiziert. Nach dem Fraktionierungsschritt wird das extrahierte Noradrenalin auf die analytische Säule transferiert und die Zeitdauer des Störsignals registriert (siehe Abbildung 109). Die maximale temporäre Ausblendung der mobilen Phase wird durch die Elution d.h. die Retentionszeit des Noradrenalins bestimmt.

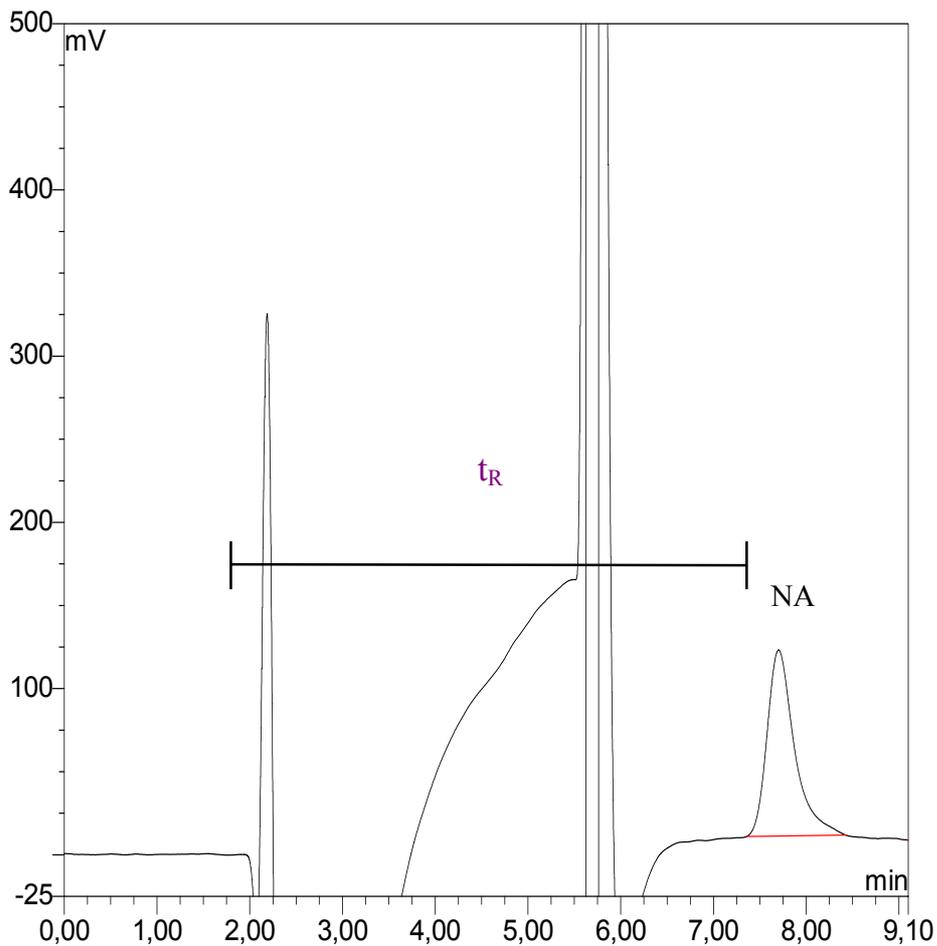


Abbildung 109: Bestimmung des Parameters t_{HC} : a) Probe: 25 μ l Wasser dotiert mit Noradrenalin 30 μ g/L b) Fraktionierung: SPE-Säule CAT-PBA, 30 x 4 mm ID, Mobile Phase: 0,2M $(NH_4)_2HPO_4$, 10mM EDTA, Methanol 5% (v/v), pH 8,7; Flussrate: 2 mL/min c) Trennung: RP-18 Säule, 150 x 4,6 mm, 3,5 μ m, 30°C; Mobile Phase: 50mM KH_2PO_4 , 0,27mM EDTA, 10mM KCl, 2,5mM Natriumoctylsulfonat, ACN 4% (v/v), pH 3,5; d) Flussrate: 1 mL/min e) EC-Detektion: Arbeitspotential 600 mV, Arbeitsbereich ± 10 nA, 30°C

Wie aus der Abbildung 109 hervorgeht beträgt dieses Zeitfenster bei einer Flussrate von 1,8 mL/min 5,5 Minuten.

6.2.2.7 Berechnung der Ventilschaltzeiten

Wie in Kapitel 6.2.1.2.6 beschrieben, wurden aus den experimentell ermittelten Parametern t_M , t_A , t_T und t_{HC} die Ventilschaltzeiten, die den Fraktionierungsschritt, den Transferschritt und den Ausblendungsschritt terminieren, berechnet.

6.2.2.7.1 Schaltzeitpunkt Fraktionierungsschritt [t_{v1}]

Wie in Kapitel 6.2.1.2.6.1 beschrieben, wird t_{v1} für Analyte mit einem t_A -Wert größer 10 min wie folgt berechnet:

$$t_{v1} = t_M + 1 \text{ min}$$

$$t_{v1} = 1 \text{ min} + 1 \text{ min}$$

$$t_{v1} = 2 \text{ min} \quad \text{bei einer Flussrate von 2,0 mL/min und 25}\mu\text{L Injektionsvolumen}$$

6.2.2.7.2 Schaltzeitpunkt Transferschritt [t_{v2}]

Wie in Kapitel 6.2.1.2.6.2 beschrieben, wird t_{v2} wie folgt berechnet:

$$t_{v2} = t_{v1} + t_T + 0,2 \text{ min}$$

$$t_{v2} = 2 \text{ min} + 0,8 \text{ min} + 0,2 \text{ min}$$

$$t_{v2} = 3 \text{ min} \quad \text{bei einer Flussrate von } 2,0 \text{ mL/min}$$

6.2.2.7.3 Schaltzeitpunkt Heart-cut [t_{v3}]

Wie in Kapitel 6.2.1.2.6.3 beschrieben, wird t_{v3} wie folgt berechnet:

$$t_{v3} = t_{v1} + t_R - 3 \text{ min}$$

$$t_{v3} = 2 \text{ min} + 5,5 \text{ min} - 2 \text{ min}$$

$$t_{v3} = 5,5 \text{ min} \quad \text{bei einer Flussrate von } 1,8 \text{ mL/min}$$

6.2.2.7.4 Recycling

Wie in den Abbildungen 102, 103 und 110 gezeigt wird, können mit Hilfe von zwei 3-Wege-Schaltventile (SV Nr. 6 und SV Nr. 15) die mobilen Phasen im Kreis geführt werden. Da ein elektrochemischer Detektor bei einem Neustart sehr viel Zeit für die Äquilibration benötigt (ca. 3,5 bis 5 Stunden), ist es vorteilhaft die Detektorzelle permanent mit der mobilen Phase zu durchströmen. Dies führt zu einem sehr hohen Verbrauch an mobiler Phase. Über das beschriebene Recycling kann jedoch der Verbrauch extrem reduziert werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Basislinie des Detektors sehr stabil bleibt.

6.2.2.8 Analysenzyklus

Abbildung 110 schematisiert den zeitlichen Ablauf der einzelnen Verfahrensschritte für die on-line SPE-HPLC-ECD Analyse einer Urinprobe. Die native Urinprobe (25 µL) wird über den automatischen Probengeber auf die SPE-Säule injiziert. Nach 2 Minuten wird das 6-Wege-Schaltventil geschaltet und es erfolgt innerhalb der nächsten Minute der Transfer der Analyten auf die nachgeschaltete analytische Säule. Nach 3 Minuten wird die SPE-Säule von der analytischen Säule durch Zurückschalten des Ventils entkoppelt. Die temporäre Ausblendung des analytischen Eluenten erfolgt über das zweite 3-Wege-Ventil, welches direkt nach der analytischen Säule positioniert ist. Dieser sog. Heart-Cut erfolgt ab der 2. Minute und endet mit Minute 5,5 der Analyse.

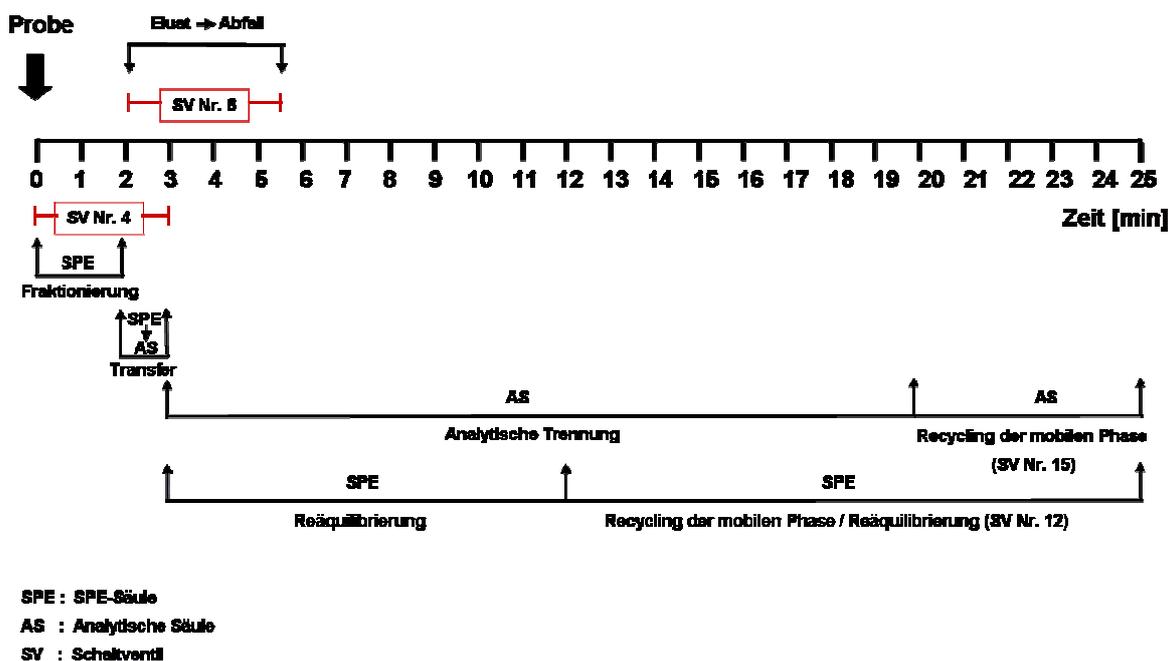


Abbildung 110: Zeitliche Abfolge der Verfahrensschritte der on-line SPE-HPLC-ECD Analyse

In Tabelle 19 ist die Abfolge der Ventilschaltzeiten sowie die Flussraten der mobilen Phasen der Pumpen A und B für das on-line SPE-HPLC-ECD Analyseverfahren aufgeführt.

Tabelle 19: On-line SPE-HPLC-ECD: Analyseprogramm

Zeit [min]	Flussrate Pumpe A [mL/min]	Flussrate Pumpe B [mL/min]	Position 6-Wege SV Nr. 4	Position 3-Wege SV Nr. 6	Position 3-Wege SV Nr. 12	Position 3-Wege SV Nr. 15
0	2	1,2	A	OFF	ON	ON
2	2	1,8	B	ON	OFF	OFF
3	2	1,8	A	ON	OFF	OFF
5,3	2	1,8	A	ON	OFF	OFF
5,5	0,3	1,2	A	OFF	OFF	OFF
12	0,3	1,2	A	OFF	ON	OFF
20	2	1,2	A	OFF	ON	ON

In Abbildung 111 ist ein repräsentatives Chromatogramm der vollständig automatisierten on-line SPE-HPLC-ECD Analyse der untersuchten Katecholamine Noradrenalin (NA), Adrenalin (A) und Dopamin (DA) in 25 μ L einer unbehandelten Probe eines 24h-Sammelurins abgebildet. Die Gewinnung, die Stabilisierung, der Transport und die Lagerung dieser Urinprobe erfolgte gemäß der, in dieser Arbeit erstmals beschriebenen, d.h. standardisierten Vorgehensweise bzw. Präanalytik.

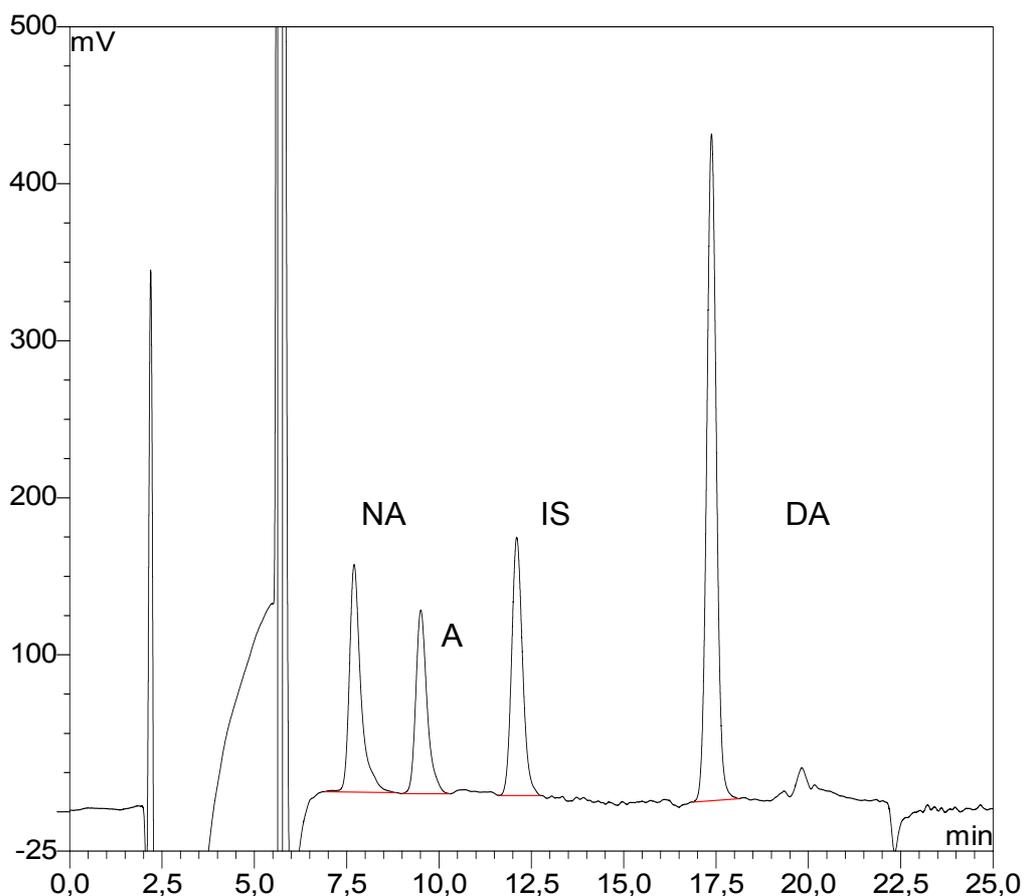


Abbildung 111: On-line SPE-HPLC-ECD: Repräsentatives Chromatogramm a) Probe: 25 μL 24h-Sammelurin (Noradrenalin, NA: 60 $\mu\text{g/L}$, 7,7 min; Adrenalin, A: 40 $\mu\text{g/L}$, 9,5 min; Dopamin, DA: 265 $\mu\text{g/L}$, 17,3 min, Interner Standard, IS: 73 $\mu\text{g/L}$, 12,1 min); b) Fraktionierung: SPE-Säule CAT-PBA, 30 x 4 mm ID; Mobile Phase: 0,2M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 10mM EDTA, Methanol 5% (v/v), pH 8,7; Flussrate: 2 mL/min c) Trennung: RP-18 Säule, 150 x 4,6 mm, 5 μm , 30°C; Mobile Phase: 50mM KH_2PO_4 , 0,27mM EDTA, 10mM KCl, 2,5mM Natriumoctylsulfonat, ACN 4% (v/v), pH 3,5; d) Flussrate: 1,2 mL/min e) Detektion: Elektrochemisch, Arbeitspotential 600 mV, Arbeitsbereich ± 10 nA, 30°C

6.2.3 Validierung

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte on-line SPE-HPLC-ECD Methode zur direkten Quantifizierung der Katecholamine Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin in Urin bzw. 24h-Sammelurin wurde vollständig validiert. Die entsprechenden Ergebnisse wurden im Journal of Chromatography B 844 (2006) 251-260 publiziert [300]. Die Durchführung der Validierung erfolgte im Rahmen eines europäischen Projektes (First Europe Objective 3, Project NO. 215269) gemeinsam mit dem

1. "Laboratory of Analytical Chemistry, Bioanalytical Chemistry Research Unit, University of Liège"
2. "Laboratory of Analytical Pharmaceutical Chemistry, Bioanalytical Chemistry Research Unit , University of Liège"
3. "Advanced Technology Corporation (ATC), Institute of Pathology, University Hospital Center of Liège".

Neben der Bestimmung der Kenngrößen Wiederfindung, Präzision, Richtigkeit, Linearität, Bestimmungsgrenzen und Nachweisgrenzen sowie eines Vergleichs zwischen off-line Routinemethode des Instituts für Klinische Chemie und der beschriebenen on-line SPE-HPLC-ECD Methode wurde auch eine sog. Risikoanalyse durchgeführt.

Mit Hilfe dieser Risikoprofile kann der Analytiker erkennen, wie zuverlässig die von ihm erarbeitete Methode für die beabsichtigte Anwendung ist. Einzelheiten sind der ausführlichen Publikation zu entnehmen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Die in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen und zum größten Teil inadäquaten Verfahrensweisen bei der Präanalytik der harngängigen Markermoleküle Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin, Normetanephrin, Metanephrin, Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure, Serotonin und 5-Hydroxyindolessigsäure führen nicht nur zu unterschiedlichen, sondern auch zu falschen Ergebnissen, die klinisch relevante Fehleinschätzungen zur Folge haben können. Selbst in den European Urinalysis Guideline [156] ist kein standardisiertes Verfahren aufgeführt. Primäres Ziel dieser Promotionsarbeit war daher die Entwicklung und klinische Erprobung eines patientenfreundlichen, standardisierten Verfahrens zur Sammlung von 24h-Urin. Eine Recherche bezüglich der Sammelbehälter für 24h-Urin ergab, dass sich diese hinsichtlich des Volumens, der Handhabung, der Gebrauchsanleitung, der Ablesbarkeit, der Lagerung, des Lichtschutzes und dem Zusatz bzw. der Vorlage eines Stabilisators grundsätzlich unterscheiden.

Zunächst wurde das optimale Fassungsvermögen eines entsprechenden Sammelbehälters ermittelt. Hierzu wurde in zwei Studien die Volumenverteilung des 24h-Sammelurins von insgesamt 120 Probanden bestimmt und über die Kreatininausscheidung auf Vollständigkeit überprüft. Um 95 % aller Sammelurine zu erfassen wird ein Volumen von 3 Litern benötigt. Bei Verwendung eines Behälters mit einem Volumen von 2 Litern – wie derzeit üblich – wird nur bei ca. 50 Prozent der Patienten ein vollständiger 24h- Urin gewonnen. Dieser Umstand kann zu einer Fehldiagnose führen. Anhand der Untersuchungen zur zeitabhängigen Veränderung des pH-Wertes von nativen und titrierten 24h-Sammelurinen, sowie der Bestimmung der Wiederfindung der untersuchten Analyten unter den jeweiligen Bedingungen gelang es, den optimalen pH-Bereich des Urins zu finden, in dem alle untersuchten Analyte stabil sind. Die für einen 24h-Sammelurin benötigte Menge an Salzsäure beträgt 54 mmol. Diese Molmenge entspricht 9 mL einer 20 %igen

Salzsäurelösung, die mit Hilfe einer speziellen Tropfflasche zu der ersten Urinfraktion hinzugegeben wird. Unter diesen Bedingungen wird eine Verätzung weitgehend ausgeschlossen und damit die Compliance des Patienten erheblich verbessert. Zwei Studien an jeweils 60 Probanden und eine weitere Studie an 50 Patienten zeigten, dass mit der ermittelten Säuremenge der erwünschte pH-Bereich von 2 bis 5 nahezu immer erreicht wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Analyten bei Raumtemperatur und nur unter Lichtschutz für mindestens 5 Tage stabil sind. Dies gestattet auch eine oftmals erwünschte Sammlung dieser Proben über einen bestimmten Zeitraum im Labor, bevor diese analysiert werden können.

Hinsichtlich der potentiellen Verätzungsgefahr des Patienten bzw. des Pflegepersonals beim Umgang mit Säuren wurde in dieser Arbeit erstmals untersucht, ob diese Gefahr dadurch minimiert werden kann, dass die Säure an einem porösen Adsorbermaterial „physisorbiert“ vorliegt. Nach einem umfangreichen „screening“ wurde ein poröser Polymerträger gefunden, der den hohen Anforderungen genügte. Ein geeigneter Adsorber sollte in Gegenwart von konzentrierter Säure eine hohe Quellfähigkeit und Langzeitstabilität besitzen; keine Verunreinigungen freisetzen oder Verbindungen generieren, die zu Interferenzen bei der nachfolgenden Analyse führen; die Zielanalyte nicht irreversibel binden und schließlich sollte ein derartiger Adsorber kostengünstig herzustellen sein. Die säurehaltige „Paste“ (Hydrogel B) stabilisiert die untersuchten Verbindungen bei Raumtemperatur – wie erwünscht – über einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen. Die Wiederfindung der untersuchten Analyte ist quantitativ. Die Verwendung dieses „Stabilisators“ führt zu keinen Interferenzen in der nachfolgenden HPLC-Trennung aller untersuchten Markermoleküle.

Basierend auf diesen Ergebnissen und Erkenntnissen wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Sarstedt AG & Co. erstmalig ein Komplett-Set für die standardisierte und patientenfreundliche 24h-Urinsammlung, das UriSet 24, entwickelt. UriSet 24 setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

1. einem lichtgeschützten d.h. braun eingefärbten Sammelbehälter mit ergonomischer Griffmulde, extra großer Öffnung, transparentem Sichtstreifen

- für eine einfache und genaue Ablesung der Füllmenge und einem Fassungsvermögen von 3 Liter.
2. einem biegsamen Kunststoffbecher (500 mL) als leicht zu handhabendes Auffang- und Umfüllgefäß
 3. einem speziellen Glasfläschchen mit Sicherheits-Zentraltropfer für die Zugabe der verdünnten Säure
 4. einem für das Labor bestimmten Transportgefäß mit einem für die Analytik der zu untersuchenden Verbindungen ausreichenden Volumen.
 5. einem übersichtlich gestalteten und selbstklebenden Etikett für die Angabe von Name, Vorname, Geburtsdatum, Körpergewicht, Geschlecht, Datum, Beginn der Sammlung, Ende der Sammlung und gesammeltes Volumen.
 6. und einem leichtverständlichen und mit Piktogrammen unterstützten Gebrauchshinweis in 8 verschiedenen Sprachen.

Das UriSet 24 wurde erfolgreich eingeführt und im Rahmen einer ersten Anwendungsbeobachtung an der hiesigen Klinik evaluiert. Die Beurteilung war von Seiten der Patienten (n=50) und des Pflegepersonals durchweg positiv. Die Praktikabilität, die Compliance, der Komfort und die Hygiene wird mit diesem neuartigen Sammelsystem wesentlich verbessert.

Die zuvor beschriebenen Untersuchungen setzten eine Quantifizierung der untersuchten Analyten voraus. Dies gilt insbesondere für die selektive und sensitive Spurenanalytik der Katecholamine in der hochkomplexen Probenmatrix Urin. In diesem Zusammenhang wurde ein vollautomatisches, routinetaugliches SPE-HPLC-ECD Analyseverfahren entwickelt, welches es erstmalig erlaubt, einen für die Katecholaminanalytik besonders selektiven und empfindlichen elektrochemischen Detektor in einem gekoppelten Zwei-Säulensystem störungsfrei zu betreiben.

Die Automation der Probenaufbereitung erfolgte über eine system-integrierte SPE-Säule. Das spezielle Packungsmaterial dieser Säule besitzt sog. „restricted access“ Eigenschaften und erlaubt neben der Affinitätschromatographischen

Anreicherung der Katecholamine eine quantitative Anreicherung der Urinmatrix über Größenausschlusschromatographie. Dieser Fraktionierungsschritt kann mehrere tausend-mal durchgeführt werden, ohne dass sich die chromatographischen Eigenschaften des Trägermaterials verändern. Die Kopplung dieser SPE-Säule mit einer analytischen Trennsäule erlaubt somit die wiederholte, direkte Injektion und Aufbereitung sowie Trennung der Katecholamine in 25 µL einer nativen 24h-Urinprobe. Über eine temporäre Ausblendung der störenden Mischfront der beiden mobilen Phasen mit Hilfe eines Drei-Wege-Schaltventils gelang es, ein stabiles elektrochemisches Detektorsignal zu erhalten.

Ein Methodenvergleich zwischen der in unserem Institut durchgeführten off-line Analyse der Katecholamine und dem in dieser Arbeit beschriebenen vollautomatisierten on-line SPE-HPLC-ECD Verfahren zeigte, dass mit beiden Verfahren übereinstimmende Ergebnisse bezüglich der Quantifizierung der untersuchten Katecholamine erhalten werden.

Das Analyseverfahren wurde vollständig validiert und die erhaltenen Ergebnisse in dem Journal of Chromatography B publiziert.

8 ALLGEMEINE EXPERIMENTELLE ANGABEN

8.1 Geräte und Materialien

Zwei-Säulen HPLC-System

Probengeber:	ASI-100, DIONEX Softron GmbH, Germering
HPLC-Gradientenpumpen:	HPLC Niederdruckpumpen mit integrierten Degaser, P680, DIONEX Softron GmbH, Germering
EC-Detektor:	EC 3000, RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, München
ECD-Zelle:	EC 4000, Modell Sputnik [®] , RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, München
Thermostat für ECD-Zelle:	Modell HT 3000, RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, München
Drei-Wege-Schaltventile:	FK1200, RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, München
HPLC-Datenauswertung:	Chromeleon V6.60, DIONEX Softron GmbH, Germering
Computer-Hardware:	Fujitsu siemens Computer, Intel Celeron Prozessor 2,4 GHz, 504 RAM
Validierungssoftware:	e.noval V1.1.a, ARLEND A s.s., Liège
Analytische Trennsäule (Katecholamine):	2130, RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, München
SPE-Säule (Katecholamine):	2131, CAT-PBA, 30x4mm, RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, München

SPE-Säule (Antimykotika)	LiChrospher® RP4 ADS, 25 x 4 mm ID, 25µm, VWR Intl.
Analytische Säule (Antimykotika)	Dionex Acclaim™ 120 C8, 3µm , 120 Å, 4,6 x 150 mm ID, DIONEX Softron GmbH, Germering
Inline Filter:	FK7400, RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, München
PEEK-Vorfilterhalter:	FK5801, RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, München
Zentrifugen:	Eppendorf Zentrifuge 3200, EPPENDORF-NETHELER-HINZ GmbH, Hamburg
Waagen:	Sartorius 1212 MP, SARTORIUS, Göttingen Precisa 125 A, PAG Oerlikon AG, Zürich
pH-Meter:	Metrohm 632, DEUTSCHE METROHM, Filderstadt
Ultraschallgerät:	Sonorex RX 106 S, BANDELIN ELECTRONIC, Berlin
Probengeber:	AS-4000, Merck-Hitachi, MERCK KGaA, Darmstadt
HPLC-Gradientenpumpen:	L-6200A, Merck-Hitachi, MERCK KGaA, Darmstadt
On-line Degaser:	DG 4000, RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, München
Datenauswertung:	D-6000 Interface HSM-Software, Merck-Hitachi, MERCK KGaA, Darmstadt
UV-Detektor:	L-4250, Merck-Hitachi, MERCK KGaA Darmstadt
Sonstiges:	HPLC-Anlagen und Materialien von der Firma RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, München

Probengefäße

Probengefäße für Probengeber	11mm CRIMPSNAP-vial, Polypropen, 500 µl, 12x 32 mm, WICOM, Heppenheim
	Polypropen Verschlusskappen mit Teflon/Silicon Septum, WICOM, Heppenheim
Sammelflasche (24Std.Urin)	UriSet 24, SARSTEDT AG & Co. Nürnbergrecht
Tiefriergefäße	Cryoröhrchen CryoLine™ System, 3,8 mL, NUNC GmbH & Co. KG, Wiesbaden

8.2 Chemikalien und Lösemittel

Chemikalien

Natriumhydroxid Titrisol 1N, MERCK, Darmstadt

Natriumoktansulfonsäure für die Ionenpaarchromatographie, MERCK, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse, MERCK, Darmstadt

Diammoniumhydrogenphosphat zur Analyse, MERCK, Darmstadt

Phosphorsäure 85% Suprapur, MERCK, Darmstadt

Salzsäure, 37%, FLUKA, Steinheim

Na-EDTA, Ethylendinitrilotetraessigsäure-di-Natriumsalz purissimum, FLUKA, Steinheim

Analyten:

Noradrenalinbitartrat (319,3 g/mol), SIGMA, Steinheim

Adrenalin > 98% (183,20 g/mol), SIGMA, Steinheim

Dopaminhydrochlorid (189,64 g/mol), MERCK, Darmstadt

3,4-Dihydroxybenzylaminhydrobromid (220,06 g/mol), FLUKA, Steinheim

Homovanillinsäure > 99% (182,17 g/mol), FLUKA, Steinheim

Vanillinmandelsäure >98% (198,17 g/mol), SIGMA, Steinheim

Metanephrinehydrochlorid >98% (233,69 g/mol), SIGMA, Steinheim

Normetanephrinhydrochlorid >98% (219,67 g/mol), SIGMA, Steinheim

Serotoninhydrochlorid (212,68 g/mol), FLUKA, Steinheim

5-Hydroxyindolessigsäure >98% (191,18 g/mol), SIGMA, Steinheim

Hydroxyprolin > 99% (131,13 g/mol), FLUKA, Steinheim

Lösemittel

Wasser für die HPLC, J.T. BAKER, Deventer Holland

Acetonitril für die HPLC, J.T. BAKER, Deventer Holland

Methanol für die HPLC, J.T. BAKER, Deventer Holland

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. C. A. Burtis, E. R. Ashwood: *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 5. Auflage, Elsevier Science, 2001
2. G. Löffler, P.E. Petrides: *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Auflage, Springer-Verlag, 2003
3. L. Thomas: *Labor und Diagnose*. 5. Auflage, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1998
4. L. A. Kaplan, A. J. Pesce, S.C. Kazmierczak: *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlations*. 4. Auflage, St. Louis, London, Philadelphia, Sydney, Toronto, Mosby, 2003
5. K. Jungermann, H. Möhler: *Biochemie: Ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, Biologie und Pharmazie*. 1. Auflage, Springer-Verlag, 1980
6. W. G. Guder, S. Narayanan, H. Wisser, B. Zawta: *Proben zwischen Patient und Labor: Der Einfluss präanalytischer Faktoren auf die Qualität von Laboratoriumsbefunden*. 2. Auflage, GIT Verlag, 2000
7. C. M. Portas, B. Bjorvatn, R. Ursin: *Serotonin and the sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies*. *Progress in Neurobiology* 2000, 60, 13-35
8. W. G. Meijer, I.P. Kema, M. Volmer, P.H. B. Willemse, E.G. E. de Vries: *Discriminating Capacity of Indole Markers in the Diagnosis of Carcinoid Tumors*. *Clinical Chemistry* 2000, 46(10), 1588-1596
9. I. P. Kema, E. G. E. de Vries, F. A. J. Muskiet: *Clinical chemistry of serotonin and metabolites*. *Journal of Chromatography B* 2000, 747, 33-48
10. A. Pesce, L. Kaplan: *Methods in clinical chemistry*. St. Louis, Mosby, 1987, 796-802
11. J. M. Feldman: *Carcinoid tumors and syndrome*, *Seminars in Oncology* 1987, 14, 237-246
12. J. M. Feldman: *Urinary serotonin in the diagnosis of carcinoid tumors*. *Clinical Chemistry* 1986, 32(5), 840-844
13. M. Koskiniemi, J. Laakso, T. Kuurne, M. Laipio, M. Harkonen: *Indole levels in human lumbar and ventricular cerebrospinal fluid and the effect of L-tryptophan administration*. *Acta Neurol Scand*. 1985, 71(2), 127-132

14. L. A. Kaplan, A. J. Pesce, S. C. Kazmierczak: *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*. 4. Auflage, St. Louis, Mosby, 2003, 558
15. A. Gironi, G. Seghieri, M. Niccolai, P. Mammini: *Simultaneous liquid-chromatographic determination of urinary vanillylmandelic acid, homovanillic acid and 5-hydroxyindolacetic acid*. *Clinical Chemistry* 1988, 34(12), 2504-2506
16. H. Goldenberg: *Specific photometric determination of 5-hydroxyindolacetic acid in urine*, *Clinical Chemistry* 1973, 19(1), 38-44
17. D. D. Koch, P. T. Kissinger: *Determination of tryptophan and several of its metabolites in physiological samples by reserved-phase liquid chromatography with electrochemical detection*. *Journal of Chromatography* 1979, 164, 441-455
18. K. Shibata, M. Onodera: *Simultaneous micro-determination of serotonin and 5-hydroxyindole-acetic acid with 5-hydroxy-N-methyltryptamine, as an internal standard, in biological materials by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*. *Journal of Chromatography* 1988, 164, 381-387
19. T. G. Rosano, J. M. Meola, T. A. Swift: *Liquid-chromatographic determination of urinary 5-Hydroxy-3-indolacetic acid, with fluorescence detection*. *Clinical Chemistry* 1982, 28(1), 207-208
20. F. A. J. Muskiet, M. C. Stratingh, G. J. Stob, B. G. Wolthers: *Simultaneous determination of the four major catecholamine metabolites and estimation of a serotonin metabolite in urine by capillary gas chromatography of their tert-butyltrimethylsilyl derivatives*. *Clinical Chemistry* 1981, 27(2), 223-227
21. T. P. Davis, C. W. Gehrke, C. W. Gehrke Jr., T. D. Cunningham, K. C. Kuo, K. O. Gerhardt, H. D. Johnson, C. H. Williams: *High-performance liquid-chromatographic separation and fluorescence measurement of biogenic amines in plasma, urine and tissue*. *Clinical Chemistry* 1978, 24(8), 1317-1324
22. J. Jouve, J. Matineau, N. Mariotte, C. Barthelemy, J. P. Muh, G. Lelord: *Determination of urinary serotonin using liquid chromatography with electrochemical detection*. *Journal of Chromatography* 1986, 378, 437-443
23. H. Tsuchiya, T. H. Hayashi, M. Tatsumi, Y. Hoshino, S. Ohtani, N. Takagi: *High-performance liquid-chromatographic analysis for serotonin and tryptamine excreted in urine after oral loading with L-tryptophan*. *Clinical Chemistry* 1989, 35(1), 43-47
24. I. P. Kema, G. E. de Vries, A. M. J. Schellings, P. E. Postmus, F. A. J. Muskiet: *Improved diagnosis of carcinoid tumors by measurement of platelet serotonin*. *Clinical Chemistry* 1992, 38(4), 534-540

25. I. P. Kema, A. M. J. Schellings, G. Meiborg, C. J. M. Hoppenbrouwers, F. A. J. Muskiet: *Influence of a serotonin- and dopamine-rich diet on platelet serotonin content and urinary excretion of biogenic amines and their metabolites*. Clinical Chemistry 1992, 38(9), 1730-1736
26. I. P. Kema, E. G. E. de Vries, M. J. H. Slooff, B. Biesma, F. A. J. Muskiet: *Serotonin, catecholamines, histamine, and their metabolites in urine, platelets, and tumor tissue of patients with carcinoid tumors*. Clinical Chemistry 1994, 40(1), 86-95
27. E. Pussard, N. Guigueno, O. Adam, J. Giudicelli: *Validation of HPLC-amperometric detection to measure serotonin in plasma, platelets, whole blood, and urine*. Clinical Chemistry 1996, 42(7), 1086-1091
28. C. Bräutigam, R. A. Wevers, R. J. T. Jansen, J. A. M. Smeitink, J. F. de Rijk-Van andel, F. J. M. Gabreels, G. F. Hoffmann: *Biochemical hallmarks of tyrosine hydroxylase deficiency*. Clinical Chemistry 1998, 44(9), 1897-1904
29. I. P. Kema, W. G. Meijer, G. Meiborg, B. Ooms, P. H. B. Willemse, E. G. E. de Vries: *Profiling of tryptophan-related plasma indoles in patients with carcinoid tumors by automated, on-line, solid-phase extraction and HPLC with fluorescence detection*. Clinical Chemistry 2001, 47(10), 1811-1820
30. Y. Yamaguchi, C. Hayashi: *Simple determination of high urinary excretion of 5-hydroxyindole-3-acetic acid with ferric chloride*. Clinical Chemistry 1978, 24(1), 149-150
31. N. C. Parker, C. B. Levtzow, P. W. Wright, L. L. Woodard, J. F. Chapman: *Uniform chromatographic conditions for quantifying urinary catecholamines, metanephrines, vanillylmandelic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid, by liquid chromatography, with electrochemical detection*. Clinical Chemistry 1986, 32(8), 1473-1476
32. W. G. Meijer, S. C. V. M. Copray, H. Hollema, I. P. Kema, N. Zwart, I. Mantingh-Otter, T. P. Links, P. H. B. Willemse, E. G. E. de Vries: *Catecholamine-synthesizing enzymes in carcinoid tumors and pheochromocytomas*. Clinical Chemistry 2003, 49(4), 586-593
33. J. M. Zuetenhorst, C. M. Korse, J. M. G. Bonfrer, E. Peter, C. B. H. W. Lamers, B. G. Taals: *Daily cyclic changes in the urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid in patients with carcinoid tumors*. Clinical Chemistry 2004, 50(9), 1634-1639
34. K. Thorre, M. Pravda, S. Sarre, G. Ebinger, Y. Michotte: *New antioxidant mixture for long term stability of serotonin, dopamine and their metabolites in automated microbore liquid chromatography with dual electrochemical detection*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 1997, 694(2), 297-303
35. T. J. Panholzer, J. Beyer, K. Lichtwald: *Coupled-column liquid chromatographic analysis of catecholamines, serotonin, and metabolites in human urine*. Clinical Chemistry 1999, 45(2), 262-268

36. RECIPE, ClinRep : *Arbeitsanleitung für die Bestimmung von VMS, HVS und 5-HIES im Urin mittels HPLC*. Version 1.2, 2001, 14
37. RECIPE: ClinRep : *Arbeitsanleitung für die Bestimmung von Serotonin im Urin mittels HPLC*. Version 3.2, 1998, 12
38. Chromsystems: *Arbeitsvorschrift für die HPLC-Analyse von 5-Hydroxyindolessigsäure im Urin*. AV 51.000, 2001, 13
39. Chromsystems: *Arbeitsvorschrift für die HPLC-Bestimmung von VMA, HVA und 5-HIAA im Urin*. AV 1.000/B, 2001, 11
40. Chromsystems: *Arbeitsvorschrift für die HPLC-Analyse von Serotonin im Urin*. AV 4.000 1999, 14
41. BIO-RAD: *Instruction manual serotonin by HPLC*. 955-902, 1999, 17
42. BIO-RAD: *Vanillylmandelic Acid (VMA), Homovanillic Acid (HVA), 5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) by HPLC Instruction Manual*. 955-110, 2001, 14
43. W. G. Guder, B. Zawta: *Die Qualität diagnostischer Proben: Empfehlung der Arbeitsgruppe Präanalytik der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin*. 2003, 48-49
44. <http://www.bioscientia.de/HINWEIS/Hinw3.htm> Probenahme, Stand Januar 2005
45. Mühlbayer, Cremer: *Laboratoriums-Untersuchungen im Institut für Klinische Chemie Kenngrößen und Hinweise*. 8. Ausgabe, Stand Juli 2003
46. Labor Dr. Gärtner: *Medizinische Laboratorium-Untersuchungen*. 11. Auflage, Weingarten, 2001-2002, 101 und 162
47. *Untersuchungsprogramm Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin*. Mönchengladbach, 1995
48. Laboratoriumsmedizin Dortmund Dr. Eberhard & Partner: *Untersuchungsprogramm 2004/2005*, 111 und 115
49. B. Neumeister, I. Besenthal, H. Liebich: *Klinikleitfaden Labordiagnostik*. 2. Auflage, Jena, Urban & Fischer, 2000
50. T. Becker, B. Olgemöller et al.: *Labor-Leistungsverzeichnis*. München <http://www.labor-bo.de>, Stand 2004
51. H. M. Schulte, M. Ludwig, G. Neumann: *Endokrinologikum: ANABIS 2005* www.endokrinologikum.com
52. Gemeinschaftspraxis Dr. Zoulek und Kollegen: *Leistungsverzeichnis 2004* <http://www.labor-zoulek.de>
53. Laboratory Corporation of America: *Leistungsverzeichnis 2003* <http://www.labcorp.com>

54. Dr. Schottdorf u. a. Gemeinschaftspraxis: *Leistungsverzeichnis 2004*. 82
<http://www.schottdorf.de>
55. Leistungsverzeichnis Weiden: *Laborprogramm 2005*. <http://synlab.de>
56. Prof. Gisela Enders & Partner: *Klinische Chemie/Endokrinologie Labor Enders Untersuchungsprogramm*. 2004, 123, <http://www.labor-enders.de>
57. Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum rechts der Isar der TU München: *Allgemeine Hinweise + Endokrinologie*. Stand 2005
<http://www.klinchem.med.tu-muenchen.de/index-untersuchungen.html>
58. Health Waikato Ltd. 2005,
http://www.hwl.co.nz/laboratory/test/biochemistry_tests/5_hydroxyindole.htm
59. S. Hong, N.H. Farag, R. A. Nelesen, M.G. Ziegler, P.J. Mills: *Effects of regular exercise on lymphocyte subsets and CD62L after psychological vs. physical stress*. Journal of Psychosomatic Research 2004, 56(3), 363-370
60. H. Kaciuba-Uscilko, J. Smorawinski, K. Nazar, J. Adrian, F. E. Greenleaf: *Catecholamine responses to environmental stressors in trained and untrained men after 3-day bed rest*. Aviation Space and Environmental Medicine 2003, 74(9), 928-936
61. G. Strobel, V. Hack, R. Kinscherf, H. Weicker: *Sustained Noradrenaline Sulfate Response in Long-Distance Runners and Untrained Subjects up to 2-H after Exhausting Exercise*. European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology 1993, 66(5), 421-426
62. D. S. Goldstein, C. Holmes, N. Patronas, I. J. Kopin: *Cerebrospinal fluid levels of catechols in patient with neurogenic orthostatic hypotension*. Clinical Science 2003, 104(6), 649-654
63. F. B. Axelrod, D. S. Goldstein, C. Holmes, I. J. Kopin: *Pattern of plasma levels of catecholamines in familial dysautonomia*. Clinical Autonomic Research 1996, 6(4), 205-209
64. E. L. Bravo, R. Tagle: *Pheochromocytoma: State-of-the-art and future prospects*. Endocrine Reviews 2003, 24(4), 539-553
65. S. A. Westphal: *Diagnosis of Pheochromocytoma*. The American Journal of the Medical Sciences 2005, 329(1), 18-21
66. A. Mena, M. Lawson, K. M. Kabadi: *Pheochromocytoma*. Endocrine Practice 1997, 3(2), 98-105
67. M. Belvedere, H. J. Plüss: *Neuroblastombehandlung*. Helvetica Paediatrica Acta 1988, 43, 423-431
68. H. B. Kushner: *Neuroblastoma: A disease requiring a multitude of imaging studies*. The Journal of Nuclear Medicine 2004, 45(7), 1172-1188

69. B. Kadegal, D. S. Goldstein: *Catecholamines and their metabolites*. Journal of Chromatography 1988, 429, 177-233
70. M. Omura, J. Saito, K. Yamaguchi, Y. Kakuta, T. Nishikawa: *Prospective study on the prevalence of secondary hypertension among hypertensive patients visiting a general outpatient clinic in Japan*. Hypertension Research 2004, 27(3), 193-202
71. K. Shannak, A. Rajput, B. Rozdilsky, S. Kish, J. Gilbert, O. Hornykiewicz: *Noradrenalin, dopamin and serotonin levels and metabolism in the human hypothalamus: observation in Parkinson's disease and normal subjects*. Brain Research 1994, 639(1), 33-41
72. O. Hornykiewicz: *Biochemical aspects of Parkinson's disease*. Neurology. 1998, 51(2), 2
73. B. E. Leonard: *Evidence for a biochemical lesion in depression*. Journal of Clinical Psychiatry 2000, 61 Suppl 6, 12-17
74. J. J. Schildkraut, I. J. Kopin, S. M. Schanberg, J. Durell: *Norepinephrine metabolism and psychoactive drugs in the endogenous depressions*. 1968. Pharmacopsychiatry. 1995, 28 Suppl 1, 24-37
75. C. Busneag, O. Teodorescu, R. Cosmatchi, E. Urdea: *Correlations between the hypertensive syndrome and catecholamine production*. Physiologie 1983, 20(2), 119-124
76. C. Busneag, R. Cosmatchi, O. Teodorescu: *Alteration of catecholamine concentration in urine and ischemic heart disease*. Physiologie 1981, 18(3), 205-207
77. I. S. Wittstein, D. R. Thiemann, J. A. Lima, K. L. Baughman, S. P. Schulman, G. Gerstenblith, K. C. Wu, J. J. Rade, T. J. Bivalacqua, H. C. Champion: *Neurohumoral features of myocardial stunning due to sudden emotional stress*. The New England Journal of Medicine 2005, 352(6), 539-548
78. P. Coulombe, J. H. Dussault, P. Walker: *Catecholamine metabolism in thyroid disease. II. Norepinephrine secretion rate in hyperthyroidism and hypothyroidism*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1977, 44(6), 1185-1189
79. G. Eisenhofer, F. Huysmans, K. Pacak, M. M. Walther, F. C. Sweep, J. W. Lend: *Plasma metanephrines in renal failure*. Kidney International 2005, 67(2), 668-677
80. R. Darwish, A. N. Elias, N. D. Varizi, M. Pahl, D. Powers, J. D. Stokes: *Plasma and urinary catecholamines and their metabolites in chronic renal failure*. Archives of Internal Medicine 1984, 144(1), 69-71
81. A. Grovas, A. Fremgem, A. Rauck, F. B. Ruymann, C. L. Hutchinson, D. P. Winchester, H. R. Menck: *The national cancer data base report on patterns of childhood cancers in the United States*. Cancer 1997, 80(12), 2321-2332

82. P. C. Wang, N. T. Buu, O. Kuchel, J. Genest: *Conjugation patterns of endogenous plasma catecholamines in human and rat. A new specific method for analysis of glucuronide conjugated catecholamines*. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 1983, 101(1), 141-151
83. N. T. Buu, O. Kuchel: *A new method for the hydrolysis of conjugated catecholamines*. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 1977, 90(4), 680-685
84. O. Kuchel, N. T. Buu: *Conjugated catecholamines and their measurement: some pharmacokinetic aspects*. Current Medical Research and Opinion 1983, 8 Suppl 3, 3-8
85. M. Nagel, H. J. Schühmann: *A sensitive method for determination of conjugated catecholamines in blood plasma*. Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry 1980, 18(7), 431-432
86. D. A. Joyce, L. J. Beilin, R. Vandongen, L. Davidson: *Plasma free and sulfate conjugated catecholamine levels during acute physiological stimulation in man*. Life Sciences 1982, 30(5), 447-454
87. B. H. Westerink, N. ten Kate: *24h excretion patterns of free conjugated and methylated catecholamines in man*. Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry 1986, 24, 513-519
88. H. Weicker: *Determination of free and sulfoconjugated catecholamines in plasma and urine by high-performance liquid chromatography*. International Journal of Sports Medicine 1988, 9 Suppl 2, 68-74
89. M. Lehmann, P. Schmid, U. Spori, J. Keul: *Sensitivity of free and conjugated plasma catecholamines as indicators of left ventricular contraction disorder of the heart*. Zeitschrift für Kardiologie 1983, 72(9), 523-528
90. R. F. Hart, K. J. Renskers, E. B. Nelson, J. A. Roth: *Localization and characterization of phenol sulfotransferase in human platelets*. Life Sciences 1979, 24, 125-130
91. K. Rask, N. T. Buu, O. Kuchel: *Regional distribution of free and sulfoconjugated catecholamines in the bovine adrenal cortex and medulla*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 1981, 62(6), 622-626
92. N. T. Buu, J. Duhaime, C. Savard, L. Truong, O. Kuchel: *Presence of conjugated catecholamines in rat brain: a new method of analysis of catecholamine sulfates*. Journal of Neurochemistry 1981, 36(2), 769-772
93. F. C. Hernandez, M. Sanchez, A. Alvarez, J. Diaz, R. Pascual, M. Perez, I. Tovar, P. Martinez: *A five-year report on experience in the detection of pheochromocytoma*. Clinical Biochemistry 2000, 33(8), 649-655

94. G. A. Ross, E. C. Newbould, J. Thomas, P. M. G. Bouloux, G. M. Besser, D. Perrett, A. Grossman: *Plasma and 24 h-urinary catecholamine concentrations in normal and patient populations*. *Annals of Clinical Biochemistry* 1993, 30, 38-44
95. S. Meites: *Pediatric clinical chemistry*. Washington DC, AACC Press, 1989
96. H. Wisser: *Determination of free catecholamines in urine*. *Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie* 1970, 8(6), 637-648
97. W. Bauersfeld, D. Ratge, E. Knoll, H. Wisser: *Determination of catecholamines in plasma by HPLC and amperometric detection. Comparison with a radioenzymatic method*. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1986 24(3), 185-188
98. P. M. Elworthy, E. R. Hitchcock: *Estimation of plasma catecholamines by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection in patients with subarachnoid haemorrhage*. *Journal of Chromatography* 1986, 380, 33-41
99. H. Weicker: *Bestimmung der freien und konjugierten Katecholamine mit HPLC und amperometrischer Detektion*. *Laboratoriumsmedizin* 1986, 10(31), 31-44
100. J. De Jong, A. J. F. Point, U. R. Tjaden: *Determination of catecholamines in urine (and plasma) by liquid chromatography after on-line sample pretreatment on small alumina or dihydroxyborylsilica columns*. *Journal of Chromatography* 1987, 414, 285-300
101. D. Talwar, C. Williamson, A. McLaughlin, A. Gill, D. St. J. O'Reilly: *Extraction and separation of urinary catecholamines as their diphenyl boronate complexes using C18 solid-phase extraction sorbent and high-performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography B* 2002, 769, 341-349
102. A. H. B. Wu, T. G. Gornet: *Preparation of urine samples for liquid-chromatographic determination of catecholamines: Bonded-phase phenylboronic acid, cation-exchange resin, and alumina adsorbents compared*. *Clinical Chemistry* 1985, 31(2), 298-302
103. H. G. Giles, S. Meggiorini: *Stability of catecholamines in urine*. *Clinical Chemistry* 1983, 29(3), 595
104. B. H. C. Westerink, F. J. Bosker, J. F. O'Hanlon: *Use of alumina, sephadex G10, and ion-exchange columns to purify samples for determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine, homovanillic acid, and 5-hydroxyindoleacetic acid in urine*. *Clinical Chemistry* 1982, 28(8), 1745-1748
105. P. Moleman: *Preservation of urine samples for assay of catecholamines and their metabolites*. *Clinical Chemistry* 1985, 31(4), 653-654
106. P. Moleman, J. van Diik: *Determination of urinary norepinephrine and epinephrine by liquid chromatography with fluorescence detection and pre-column derivatization*. *Clinical Chemistry* 1990, 36(5), 732-736

107. N. Marchese, S. Canini, L. Fabi, L. Famularo: *Paediatric reference values for urinary catecholamine metabolites evaluated by high performance liquid chromatography and electrochemical detection*. European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry 1997, 35(7), 533-537
108. S. Ito, T. Kato, K. Maruta, K. Jimbow, K. Fujita: *"Total" acidic metabolites of catecholamines in urine as determined by hydrolysis with hydriodic acid and liquid chromatography: application to patients with neuroblastoma and melanoma*. Clinical Chemistry 1985, 31(7), 1185-1188
109. T. J. Panholzer, J. Beyer, K. Lichtwald: *Coupled-column liquid chromatographic analysis of catecholamines, serotonin, and metabolites in human urine*. Clinical Chemistry 1999, 45(2), 262-268
110. Z. S. K. Lee, J. A. J. H. Critchley: *Simultaneous measurement of catecholamines and kallikrein in urine using boric acid preservative*. Clinica Chimica Acta 1998, 276, 89-102
111. Y. P. Lu, C. S. Ho, T. W. L. Mak: *Formate buffer as preservative for urinary free catecholamine measurement*. Annals of Clinical Biochemistry 2004, 41, 39-42
112. K. Miki, A. Sudo: *Effect of urine pH, storage time, and temperature on stability of catecholamines, cortisol, and creatinine*. Clinical Chemistry 1998, 44, 8 Technical Briefs, 1759-1762
113. M. D. De Bellis, A. S. Baum, B. Birmaher, M. S. Keshavan, C. H. Eccard, A. M. Boring, F. J. Jenkins, N. D. Ryan: *Developmental traumatology part I: biological stress systems*. Biological Psychiatry 1999, 45, 1259-1270
114. E. C. Y. Chan, P. Y. Wee, P. C. Ho: *Evaluation of degradation of urinary catecholamines and metanephrines and deconjugation of their sulfoconjugates using stability-indicating reversed-phase ion pair HPLC with electrochemical detection*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2000, 22, 515-526
115. F. Boomsma, G. Alberts, I. van Eijk, A. J. Man in 't Veld, M. A. D. H. Schalekamp: *Optimal collection and storage conditions for catecholamine measurements in human plasma and urine*. Clinical Chemistry 1993, 39(12), 2503-2508
116. E. Hollenbach, C. Schulz, H. Lehnert: *Rapid and sensitive determination of catecholamines and the metabolite 3-methoxy-4-hydroxyphen-ethyleneglycol using HPLC following novel extraction procedures*. Life Sciences 1998, 63(9), 737-750
117. R. nat, A. Greenberg, O. Zinder: *Catecholamine determination in sequential urine voiding: a method for detecting pheochromocytoma in patients without elevated urinary catecholamines*. Israel Journal of Medical Sciences 1991, 27(1), 12-16

118. MCL Dürdingen: *MCL Leistungskatalog. Band Catecholamine*. Stand: Januar 2005 <http://217.192.239.69/Leistungskatalog/PrintAnalysis.aspx>.
119. Kantonsspital St. Gallen: *Band Catecholamine* Das Institut für Klinische Chemie und Hämatologie (IKCH). Stand: Januar 2005 <http://www.ikch.ch/vademecum.htm>
120. A. Premel-Cabic, A. Turcant, P. Allain: *Normal reference intervals for free catecholamines and their acid metabolites in 24-h urines from children, as determined by liquid chromatography with amperometric detection*. *Clinical Chemistry* 1986, 32(8), 1585-1587
121. E. A. M. Gerlo, C. Sevens: *Urinary and plasma catecholamines and urinary catecholamine metabolites in pheochromocytoma: diagnostic value in 19 cases*. *Clinical Chemistry* 1994, 40(2), 250-256
122. A. Rivero-Marcotegui, A. Grijalba-Uche, M. Palacios-Sarrasqueta, S. Garcia-Merlo: *Effect of the pH and the importance of the internal standard of the urinary catecholamines by high-performance liquid chromatography*. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1995, 33(11), 873-875
123. H. Weicker, M. Weiss, H. Hägele und G. Michel: *Nachweis von konjugierten Katecholaminen mit der HPLCA in Serum, Urin und Liquor*. Hrsg.: H. Aigner: *Königsteiner Chromatographie-Tage* 1985, 288-306
124. G. P. Jackman: *Differential assay for urinary catecholamines by use of liquid chromatography with fluorescence detection*. *Clinical Chemistry* 1981, 27(7), 1202-1204
125. RECIPE: *ClinRep Arbeitsanleitung für die Bestimmung der Katecholamine im Urin mittels HPLC*. Version 3.3, 1998, 12
126. H.-W. Schiwara, J. Kunz, H. D. Köster, J.-W. Wittke, A. Gerritzen: *Analysenübersicht mit Versandvorschrift 2001, 1-95*
127. BIO-RAD: *Instruction Manual Urinary Catecholamines by HPLC*. 600-0083, 2000, 7
128. Chromsystems Instruments & Chemical GmbH: *Arbeitsvorschrift für die HPLC-Analyse von Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin im Urin*. AV6.000, 2001, 12
129. G. G. Klee: *Maximizing efficacy of endocrine tests: Importance of decision-focused testing strategies and appropriate patient preparation*. *Clinical Chemistry* 1999, 45(8), 1323-1330
130. T. G. Rosano, T. A. Swift, L. W. Hayes: *Advances in catecholamine and metabolite measurements for diagnosis of pheochromocytoma*. *Clinical Chemistry* 1991, 37, 1854-1867
131. H. Wisser, D. Stamm: *Untersuchungen zur Bestimmung der 4-Hydroxy-3-methoxy-mandelsäure (Vanillinmandelsäure) im Urin*. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1970, 8, 21-26

132. D. F. Davidson: *Simultaneous assay for urinary 4-hydroxy-3-methoxy-mandelic acid, 5-hydroxyindolacetic acid and homovanillic acid by isocratic HPLC with electrochemical detection*. *Annals of Clinical Biochemistry* 1989, 26, 137-143
133. A. Nakagawara, Y. Zaizen, K. Ikeda, S. Suita, H. Ohgami, N. Nagahara, Y. Sera, H. Akiyama, K. Kawakami, J-I. Uchino: *Different genomic and metabolomic patterns between mass screening-positive and mass screening-negative laterpresenting neuroblastomas*. *Cancer* 1991, 68, 2037-2044
134. A. O'Meara, W. Tormey, R. J. Fitzgerald, M. Fitzgibbon, D. Kenny: *Interpretation of random urinary catecholamines and their metabolites in neuroblastoma*. *Acta Paediatrica* 1994, 83, 88-92
135. F. H. Schilling, R. Erttmann, S. Dohrmann, N. Erb, K. Winkler, U. Groß, J. Treuner: *Neuroblastom-Früherkennung in Deutschland*. *Klinische Pädiatrie* 1992, 204, 282-287
136. J. A. Kaye, M. J. Warhol, C. Kretschmar, L. Landsberg, E. III Frei : *Neuroblastoma in adults*. *Cancer* 1986, 58, 1149-1157
137. M. Tuchman, W. G. Woods: *Introduction: Neuroblastoma screening*. *American Journal of Pediatric Hematology / Oncology* 1992, 14, 95-96
138. I. P. Kema, G. Meiborg, G. T. Nagel, G. J. Stob, F. A. J. Muskiet: *Isotope dilution ammonia chemical ionization mass fragmentographic analysis of urinary 3-O-methylated catecholamine metabolites*. *Journal of Chromatography B* 1993, 617, 181-189
139. P. H. Gamache, M. L. Kingery, I. N. Acworth: *Urinary metanephrine and normetanephrine determined without extraction by using liquid chromatography and coulometric array detection*. *Clinical Chemistry* 1993, 39(9), 1825-1830
140. V. Kairisto, P. Koskinen, K. Mattila, J. Puikkonen, A. Virtanen, I. Kantola, K. Irjala: *Reference intervals for 24-h urinary normetanephrine, metanephrine, and 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid in hypertensive patients*. *Clinical Chemistry* 1992, 38(3), 416-420
141. P. Volin: *Determination of urinary normetanephrine, metanephrine and 3-methoxytyramine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: comparison between automated column-switching and manual dual-column sample purification methods*. *Journal of Chromatography B* 1992, 578, 165-174
142. P. Kaplan, M. Tejral, I. Nentwich: *The determination of urinary metanephrine and normetanephrine by high performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection*. *Journal of Liquid Chromatography* 1992, 15(14), 2561-2579

143. N. C. Parker, C. B. Levtzow, P. W. Wright, L. L. Woodard, J. F. Chapman: *Uniform chromatographic conditions for quantifying urinary catecholamines, metanephrines, vanillylmandelic acid, 5-Hydroxyindoleacetic acid, by liquid chromatography with electrochemical detection*. Clinical Chemistry 1986, 32(8), 1473-1476
144. P. J. Orsulak, P. Kizuka, E. Grab, J. J. Schildkraut: *Determination of urinary normetanephrine and metanephrine by radial-compression liquid chromatography and electrochemical detection*. Clinical Chemistry 1983, 29(2), 305-309
145. R. H. Christenson, C. D. McGohtlin, R. Hedrick, J. C. Cate, IV: *Simplified fluorometry of total metanephrines in urine*. Clinical Chemistry 1982, 28(5), 1204-1207
146. C. Canfell, S. R. Binder, H. Khayam-Bashi: *Quantitation of urinary Normetanephrine and metanephrine by reversed-phase extraction and mass-fragmentographic analysis*. Clinical Chemistry 1982, 28(1), 25-28
147. RECIPE: *ClinRep: Arbeitsvorschrift für die Bestimmung der Metanephrine im Urin mittels HPLC*. Version 4.3, 1998, 13
148. Chromsystems: *Arbeitsvorschrift für die HPLC-Analyse von Normetanephrin, Metanephrin und 3-Methoxythyramin im Urin*. AV 2.000, 1998, 11
149. BIO-RAD: *Instruction Manual Urinary Metanephrines by HPLC*. 1995, 5-6
150. G. Eisenhofer, T. T. Huynh, M. Hiroi, K. Pacak: *Understanding catecholamine metabolism as a guide to the biochemical diagnosis of pheochromocytoma*. Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders 2001, 2, 297-311
151. Ilamed AG: *Urin-Konservierung, Konservierung bei Urinalysen*. Stand Januar 2005, <http://www.ilamed.ch>
152. Labor Dr. Gärtner: *Medizinische Laboratorium-Untersuchungen*. 11. Auflage, 2001-2002, 183 und 97
153. Dr. med. J. Arnold: *Analytik Manual*. Stand Mai 2005, www.medlab.de/
154. Medizinische Laboratorien Düsseldorf: *Untersuchungsprogramm*. Stand Mai 2005, <http://www.labor-duesseldorf.de>
155. Aktuelle Labordiagnostik. Hrsg.: Labor Prof. Arndt & Partner: 25.01.2005. www.labor-arndt-partner.de
156. European Urinalysis Guidelines: *Summary*. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigations 2000, 60, 1-96
157. B. S. Jr. Arant: *Screening for urinary abnormalities: worth doing and worth doing well*. Lancet 1998, 351, 307-308

158. European Committee for Standardization (CEN): EN829. *In vitro diagnostic systems: Transport packages for medical and biological specimens*. Brussels: CEN 1996
159. C. Lentner: *Units of Measurement, Body Fluids, Composition of the Body, Nutrition*. Geigy Scientific Tables, Volume 1, CIBA-GEIGY 1981
160. G. Einer, B. Zawta: *Präanalytikfibel: Kooperation von Arzt und Labor*. 2. Auflage, Johann Ambrosius Barth 1991
161. M. K. Schwartz: *Interference in diagnostic biochemical procedures*. Adv. clin. Chem. 1973, 16, 1-45
162. H. Wisser : *Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie*. Schattauer, 1987
163. H. Keller: *Klinisch-chemische Labordiagnostik für die Praxis*. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, 1991, 147
164. K.-S. Boos, B. Wilmers, R. Sauerbrey, E. Schlimme: *Development and Performance of an automated HPLC-Analyzer for Catecholamines*. Chromatographia 1987, 24, 363-370
165. K.-S. Boos, B. Wilmers, E. Schlimme, R. Sauerbrey: *On-line sample processing and analysis of diol compounds in biological fluids*. Journal of Chromatography 1988, 456, 93-104
166. R. D. Mc Dowall: *Sample preparation for biomedical analysis*. Journal of Chromatography, 1989 49, 23-58
167. H. Lingeman, R. D. Mc Dowall, U. A. Th. Brinkman: *Guidelines for bioanalysis using column liquid chromatography*. Trends in Analytical Chemistry 1991, 10, 48-59
168. H. Auterhoff, J. Knabe, H.-D. Höltje: *Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie*. 13. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH 1994
169. A. Junker-Buchheit, GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium 1998 12, 1274
170. K. E. Goeringer, B. K. Logan, G. D. Christian: *Identification of tramadol and its metabolites in blood from drug-related deaths and drug-impaired drivers*. Journal of Analytical Toxicology 1997 21(7), 529-537
171. S. T. Ho, J. J. Wang, W. J. Liaw, C. M. Ho, J. H. Li: *Determination of tramadol by capillary gas chromatography with flame ionization detection Application to human and rabbit pharmacokinetic studies*. Journal of Chromatography B 1999, 736, 89-96
172. A. Polettoni, A. Groppi, M. Montagna: Adv. Forens. Sci.; Proc. Meet. Int. Assoc. Forensic Sci. 1995, 13, 197
173. H. Lingemann: Methodol. Surv. Bioanal. Drugs 1998, 25, 55-63

174. J. Kehr: *Determination of glutamate and aspartate in microdialysis samples by reversed-phase column liquid chromatography with fluorescence and electrochemical detection*. Journal of Chromatography B 1998, 708(1-29), 27-38
175. R. A. Biddlecombe, S. Pleasance: *Automated protein precipitation by filtration in the 96-well format*. Journal of Chromatography B 1999, 734, 257-265
176. K.-S. Boos, B. Wilmers, R. Sauerbrey, E. Schlimme: *Development of a fully-automatic catecholamine analyzer*. Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie 1986 324(3-4), 320-321
177. B. Wilmers, K.-S. Boos, R. Sauerbrey, E. Schlimme: *Totally automatic HPLAC-HPLC Catecholamine analysis in urine*. Chromatographia 1986, 22(7-12), 437
178. K.-S. Boos, B. Wilmers, R. Sauerbrey, E. Schlimme: *Catecholamines: online quantification and post-column derivatization*. Chromatographia 1988, 25(3), 199-204
179. A. Fournier, J. M. Achard: *Mnemotechnical note on the use of Cockcroft creatinine clearance formula for the validation of a 24-h urine collection*. Nephrology Dialysis Transplantation 2000, 15, 1677-1678
180. J.R. Crout: *Catecholamines in urine: Standard Methods of Clinical Chemistry*. Academic Press Inc. 1961, 62-80
181. Z. Khane, A. H. Esser, N.S. Kline, P. Vestergaard: *Estimation of conjugated epinephrine and norepinephrine in urine*. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 1967, 69, 1042-1050
182. R. C. Causon, M. J. Brown: *Catecholamine measurements in pheochromocytoma: a review*. Annals of Clinical Biochemistry 1982, 19, 396-404
183. J. C. Crout, A. Sjoerdsma: *The clinical and laboratory significance of serotonin and catecholamines in bananas*. New England Journal of Medicine 1959, 261, 1959
184. L. D. Mell, A. B. Gustafson: *Urinary free norepinephrine and dopamine determined by reverse-phase high-pressure liquid chromatography*. Clinical Chemistry 1977, 23, 473-476
185. G. M. Anderson, J. G. Young, P. E. Jatlow, D. J. Cohen: *Urinary free catecholamines determined by liquid chromatography-fluorometry*. Clinical Chemistry 1981, 27, 2060-2063
186. N. L. Benowitz: *Pheochromocytoma*. Advances in Internal Medicine 1990, 35, 195-219
187. J. Wassell, P. Reed, J. Kane, C. Weinkove: *Freedom from drug interference in new immunoassays for urinary catecholamines and metanephrines*. Clinical Chemistry 1999, 45(12), 2216-2223

188. J. Westermann, W. Hubl, N. Kaiser and L. Salewski: *Simple, rapid and sensitive determination of epinephrine and norepinephrine in urine and plasma by non-competitive enzyme immunoassay, compared with HPLC method.* Clinical Laboratory 2002, 48, 61-71
189. A. H. Anton, D. F. Sayre: *Study of factors affecting aluminum oxide-trihydroxyindole procedure for analysis of catecholamines.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1962, 138(3), 360f
190. H. Weicker, M. Feraudi, H. Hägele und R. Pluto: *Electrochemical detection of catecholamines in urine and plasma after separation.* Clinica Chimica Acta 1984, 141 (1), 17-25
191. H. P. Nissen, W. Wehrmann und H. W. Kreysel: *Anwendung der HPLC mit elektrochemischer Detektion zur Bestimmung der Plasma-Catecholamine - ein Erfahrungsbericht nach zweijähriger Anwendung.* Königsteiner Chromatographietage, Vortragsband 1985, 307-323
192. B. Dirks, C. Vorwalter, A. Grünert, F. W. Ahnefeld: *Basal plasma-catecholamine-level determination using HPLC-ED and different sample cleanup techniques.* Chromatographia 1988, 25 (3), 223-229
193. G. C. Davis, P.T. Kissinger und R. E. Shoup: *Strategies for determination of serum or plasma norepinephrine by reverse-phase-liquid-chromatography.* Analytical Chemistry 1981, 53 (2), 156-159
194. G. Springsteen und B. Wang: *A detailed examination of boronic acid-diol complexation.* Tetrahedron 2002, 58, 5291-5300
195. S. Higa, T. Suzuki, A. Hayashi, I. Tsuge und Y. Yamamura: *Isolation of catecholamines in biological-fluids by boric-acid gel.* Analytical Biochemistry 1977, 77(1), 18-24
196. F. Smedes, J. C. Kraak und H. Poppe: *Simple and fast solvent-extraction system for selective and quantitative isolation of adrenaline, noradrenaline and dopamine from plasma and urine.* Journal of Chromatography 1982, 231(1), 25-39
197. H.-J. Bauch, U. Kelsch und W. H. Hauss: *A rapid, selective and quantitative-determination of epinephrine and norepinephrine from plasma using solvent-extraction combined with HPLC-separation and electrochemical detection.* Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry 1986, 24(9), 651-658
198. H. Hallman, L.-O. Farnebo, B. Hamburger und G. Jonsson: *Sensitive method for determination of plasma catecholamines using liquid-chromatography with electrochemical detection.* Life Sciences 1978, 28(10), 1049-1052
199. S. Allenmarks, L. Hedman und A. Söderberg: *Microanalysis of catecholamines in human-plasma by high-performance-liquid-chromatography with amperometric detection as compared with a radioenzymatic method.* Microchemical Journal 1980, 25(4), 567-575

200. P. Hjemdahl, M. Daleskog und T. Kahan: *Determination of plasma-catecholamine by high-performance-liquid-chromatography with electrochemical detection-comparison with a radioenzymatic method*. Life Sciences 1979, 25(2), 131-138
201. S. Allenmark, L. Hedman: *Cation-exchange liquid-chromatography with amperometric detection as a method for the analysis of endogenous catecholamine concentrations in plasma or serum*. Journal of Liquid Chromatography 1979, 2(2), 277-286
202. A. Yamatodani, H. Wada: *Automated-analysis for plasma epinephrine and norepinephrine by liquid-chromatography, including a sample cleanup procedure*. Clinical Chemistry 1981, 27(12), 1983-1987
203. Y. Yui, M. Kimura, Y. Itokawa, C. Kawai: *Ultramicro method for the determination of picogram amounts of norepinephrine and epinephrine by high-performance-liquid-chromatography*. Journal of Chromatography 1979, 177(2), 376-379
204. Y. Yui, T. Fujita, T. Yamamoto, Y. Itokawa und C. Kawai: *Liquid-chromatographic determination of norepinephrine and epinephrine in human-plasma*. Clinical Chemistry 1980, 26(2), 194-196
205. I. Molnar, T. C. Horvat: *Reverse-phase chromatography of polar biological substances-separation of catechol compounds by high-performance liquid-chromatography*. Clinical Chemistry 1976, 22(9), 1497-1502
206. D. P. Wittmer, N. O. Nuessle und G. Haney: *Simultaneous analysis of tartrazine and its intermediates by reversed phase liquid-chromatography*. Analytical Chemistry 1975, 47(8), 1422-1423
207. S. P. Sood, L. E. Sartori, D. P. Wittmer und W.G. Haney: *High-pressure liquid-chromatographic determination of ascorbic-acid in selected food and multivitamin products*. Analytical Chemistry 1976, 48(6), 796-798
208. J. H. Knox und G. R. Laird: *Soap chromatography-new high-performance liquid-chromatographic technique for separation of ionizable materials-deystuff intermediates*. Journal of Chromatography 1976, 122, 17-34
209. J. H. Knox und J. Jurand: *Separation of catecholamines and their metabolites by adsorption, ion-pair and soap chromatography*. Journal of Chromatography 1976, 125(1), 89-101
210. K. S. Boos, B. Wilmers, R. Sauerbrey, E. Schlimme: *Development and performance of an automated HPLC-Analyzer for catecholamines*. Chromatographia 1987, 24, 363-370
211. J. Weisslon: *Chromatography - a review of recent development*. Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie 1987, 327(5-6), 451-455

212. A. M. Krstulovic, S. W. Dziedzic, L. Bertanidziedzic, D. E. Dirico: *Plasma-catecholamines in hypertension and pheochromocytoma determined using ion-pair reversed-phase chromatography with amperometric detection-investigation of the separation mechanism and clinical methodology*. Journal of Chromatography 1981, 217, 523-537
213. A. Bartha, G. Vigh, H. Billiet, L. Degalan: *Effect of the type of ion-pairing reagent in reversed-phase ion-pair chromatography*. Chromatographia 1985, 20(10), 587-590
214. T. Jira: *Relations of retention in the ion-pair-reversed phase-chromatography*. Pharmazie 1991, 46(12), 857-860
215. R. M. Riggan und P. T. Kissinger: *Determination of catecholamines in urine by reverse-phase liquid-chromatography with electrochemical detection*. Analytical Chemistry 1977, 49(13), 2109-2111
216. T. P. Moyer, N. S. Jiang, G. M. Tyce, S. G. Sheps: *Analysis for urinary catecholamines by liquid-chromatography with amperometric detection-methodology and clinical interpretation of results*. Clinical Chemistry 1979, 25(2), 256-263
217. G. P. Jackman: *Differential assay for urinary catecholamines by use of liquid-chromatography with fluorescence detection*. Clinical Chemistry 1981, 27(7), 1202-1204
218. C. Julien, C. Rodriguez, G. Cuisinaud, N. Bernard, J. Sassard: *Measurement of urinary catecholamines and their catechol metabolites and precursor by liquid-chromatography with column-switching and online fluorimetric and electrochemical detection*. Journal of Chromatography 1985, 344, 51-60
219. J. Odink, H. Sandman und W. H. P. Schreuers: *Determination of free and total catecholamines and salsolinol in urine by ion-pair reversed-phase liquid-chromatography with electrochemical detection after a one-step sample cleanup*. Journal of Chromatography 1986, 377, 145-154
220. R. C. Causon, M. E. Carrthers und R. Rodnight: *Assay of plasma-catecholamines by liquid-chromatography with electrochemical detection*. Analytical Biochemistry 1981, 116(1), 223-226
221. C. L. Davies und S. G. Molyneux: *Routine determination of plasma-catecholamines using reversed-phase, ion-pair high-performance liquid-chromatography with electrochemical detection*. Journal of Chromatography 1982, 231(1), 41-51
222. R. L. Michaud, M. J. Bannon und R. H. Roth: *The use of C-8-octyl columns for the analysis of catecholamines by ion-pair reversed-phase liquid-chromatography with amperometric detection*. Journal of Chromatography 1981, 225(2), 335-345
223. G. C. Davis, P. T. Kissinger und R. E. Shoup: *Strategies for determination of serum or plasma norepinephrine by reverse-phase liquid-chromatography*.

- Analytical Chemistry 1981, 53(2), 156-159
224. T. Seppala, M. Scheinin, A. Capone und M. Linnoila: *Liquid-chromatographic assay for CSF catecholamines using electrochemical detection*. Acta Pharmacologica et Toxicologica 1984, 55(2), 81-87
225. Y. Yui und C. Kawai: *Comparison of the sensitivity of various post-column methods for catecholamine analysis by high-performance liquid-chromatography*. Journal of Chromatography 1981, 206(3), 586-588
226. L. D. Mell, A. R. Dasler und A. B. Gustafson: *Pre-column fluorescent derivatization for high-pressure liquid-chromatography with ortho-phthalaldehyde - separation of urinary catecholamines*. Journal of Liquid Chromatography 1978, 1(3), 261-277
227. G. Schwedt und H. H. Bussemas: *High-performance liquid-chromatography of catecholamines as dansyl derivatives with fluorescence detection*. Chromatographia 1976, 9(1), 17-19
228. R. W. Frei, M. Thomas und I. Frei: *Study of adrenaline-dansyl derivatives for separation by liquid-chromatography - application to blood-plasma analysis*. Journal of Liquid Chromatography 1978, 1(4), 443-455
229. K. IMAI: *Fluorimetric assay of dopamine, norepinephrine and their 3-O-methyl metabolites by using fluorecamine*. Journal of Chromatography 1975, 105(1), 135-140
230. H. Nohta, A. Mitsui und Y. Ohkura: *Spectrofluorimetric determination of catecholamines with 1,2-diphenylethylenediamine*. Analytica Chimica Acta 1984, 165, 171-176
231. K. Mori: *High-speed ion-exchange chromatographic assay in the picomole range of biogenic amines*. Industrial Health 1974, 12, 171-174
232. K. Mori: *Automated measurement of catecholamines in urine, plasma and tissue homogenates by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection*. Journal of Chromatography 1981, 218, 631-637
233. G. Schwedt: *Separation and fluorimetric determination of adrenaline and noradrenaline - combination of a high-pressure liquid chromatograph with a automatic-analysis system*. Journal of Chromatography 1977, 143(5), 463-471
234. K.-I. Okamoto, Y. Ishida und K. Asai: *Separation and detection of small amounts of catecholamines by high-performance liquid-chromatography*. Journal of Chromatography 1978, 167, 205-217
235. L. M. Nelson und M. Carruthers: *Semiautomated fluorimetric method for the estimation of urinary catecholamines using high-performance liquid-chromatography*. Journal of Chromatography 1980, 183(3), 295-302
236. J. Ruter, U. P. Kurz und B. Neidhart: *Solid-phase reactors as an analytical tool in the determination of urinary noradrenaline and adrenaline*. Journal of Liquid Chromatography 1985, 8(13), 2475-2496

237. B. Neidhart, J. Rüter, C. Lippmann, P. Deutschmann und I. Walker: *Automated-system for the analysis of free urinary catecholamines using a column switching technique and a heterogeneous reaction detector*. Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie 1986, 323(8), 880-886
238. M. Goto, E. Sakurai und D. Ishii: *Dual electrochemical detector for micro high-performance liquid-chromatography and its application to the selective detection of catecholamines*. Journal of Chromatography 1982, 238(2), 357-366
239. M. Goto, G. Zou und D. Ishii: *Determination of catecholamines in human-serum by micro high-performance liquid-chromatography with micro precolumn and dual electrochemical detection*. Journal of Chromatography 1983, 275(2), 271-281
240. P. Surmann: *Electrochemical detection in HPLC*. Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie 1983, 316(4), 373-381
241. B. Neidhart, K.-P. Kringe, C. Lippmann und P. Deutschmann: *Anwendung der multidimensionalen HPLC mit Säulenschalttechnik auf die routinemäßige Analyse der Katecholamine*. Königsteiner Chromatographie-Tage, Vortragsband 1982, 151-168
242. M. Goto, T. Nakamura und D. Ishii: *Micro high-performance liquid-chromatographic system with micro precolumn and dual electrochemical detector for direct injection-analysis of catecholamines in body-fluids*. Journal of Chromatography 1981, 226, 33
243. B. Neidhart, K.-P. Kringe, C. Lippmann, W. Brockmann: *Richtigkeit und Genauigkeit der Catecholamin-Analyse: ein Intra-Laboratorium-Methodenvergleich*. Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie, 1983, 315, 232-240
244. E. Hagemeyer, K.-S. Boos, E. Schlimme, K. Lechtenböcker und A. Kettrup: *Synthesis and application of a boronic acid substituted silica for high-performance liquid affinity-chromatography*. Journal of Chromatography 1983, 268(2), 291-295
245. K. Kemper, E. Hagemeyer, K.-S. Boos und E. Schlimme: *Direct cleanup and analysis of urinary catecholamines*. Journal of Chromatography 1984, 336(2), 374-379
246. K. Kemper, E. Hagemeyer, D. Ahrens, K.-S. Boos und E. Schlimme: *Group-selective prefractionation and analysis of urinary catecholamines by online HPLAC-HPLC chromatography*. Chromatographia 1984, 19, 288-291
247. P. O. Edlund und D. Westerlund: *Direct injection of plasma and urine in automated analysis of catecholamines by coupled-column liquid chromatography with post-column derivatization*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 1984, 2(2), 315-333

248. D. Westerlund: *Direct injection of plasma into column liquid-chromatographic systems*. Chromatographia 1987, 24, 155-164
249. G. Grossi, A. Bargossi, A. Lippi und R. Battistoni: *A fully automated catecholamines analyzer based on cartridge extraction and HPLC separation*. Chromatographia 1987, 24, 842-846
250. R. Zhu und W. T. Kok: *Determination of catecholamines and related compounds by capillary electrophoresis with postcolumn terbium complexation and sensitized luminescence detection*. Analytical Chemistry 1997, 69, 4010-4016
251. H. Siren, U. Karjalainen: *Study of catecholamines in patient urine samples by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A 1999, 853, 527-533
252. H. Siren, M. Mielonen, M. Herlevi: *Capillary electrophoresis in the determination of anionic catecholamine metabolites from patients' urine*. Journal of Chromatography A 2004, 1032 (1-2), 289-297
253. K. Vuorensola, H. Siren und U. Karjalainen: *Determination of dopamine and methoxycatecholamines in patient urine by liquid chromatography with electrochemical detection and by capillary electrophoresis coupled with spectrophotometry and mass spectrometry*. Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 2003, 788 (2), 277-289
254. K. Vuorensola, H. Siren: *Determination of urinary catecholamines with capillary electrophoresis after solid-phase extraction*. Journal of Chromatography A 2000, 895 (1-2), 317-327
255. B. Baena, A. Cifuentes und C. Barbas: *Analysis of carboxylic acids in biological fluids by capillary electrophoresis*. Electrophoresis 2005, 26(13), 2622-2636
256. M. P. Llaveró, S. Rubio, A. Gomez-Hens und D. Perez Bendito: *Improved trihydroxyindole method for the simultaneous stopped-flow spectrofluorimetric determination of epinephrine and norepinephrine in urine*. Analytica Chimica Acta 1990, 229(1), 27-33
257. P. Canizares, M. D. Luque de Castro: *On-line coupling of isolation in situ concentration integrated with derivative synchronous spectrofluorimetry for the simultaneous determination of epinephrine and norepinephrine in urine*. Analytica Chimica Acta 1995, 317(1-3), 335-341
258. B. Kennedy, M. G. Ziegler: *A more sensitive and specific radioenzymatic assay for catecholamines*. Life Sciences 1990, 47(23), 2143-2153
259. J. F. Murphy, D. H. Davies und C. J. Smith: *The development of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the catecholamines adrenaline and noradrenaline*. Journal of Immunological Methods 1992, 154(1), 89-98
260. R. P. H. Nikolajsen, A. M. Hansen: *Analytical methods for determining urinary catecholamines in healthy subjects*. Analytica Chimica Acta 2001, 449, 1-15

261. D. C. Chen, D. Z. Zhan, C.W Cheng, A. C. Liu und C. H. Chen: *Determination of urine catecholamines by capillary electrophoresis with dual-electrode amperometric detection*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 2001, 750(1), 33-39
262. D. C. Chen, S. S. Chang und C.H. Chen: *Parallel-opposed dual-electrode detector with recycling amperometric enhancement for capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry 1999, 71(15), 3200-3205
263. E. C. Y. Chan, P. Y. Wee, P. Y. Ho und P. C. Ho: *High-performance liquid chromatographic assay for catecholamines and metanephrines using fluorimetric detection with pre-column 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride derivatization*. Journal of Chromatography B 2000, 749(2), 179-189
264. E. C. Y. Chan und P. C. Ho: *High-performance liquid chromatography / atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric method for the analysis of catecholamines and metanephrines in human urine*. Rapid Communication in Mass Spectrometry 2000, 14(21), 1959-1964
265. J. Kehr: *Determination of catecholamines by automated precolumn derivatization and reversed-phase column liquid chromatography with fluorescence detection*. Journal of Chromatography A 1994, 661(1-2), 137-142
266. C. Sarzanini, E. Mentasi und M. Nerva: *Determination of catecholamines by ion chromatography and electrochemical detection*. Journal of Chromatography A 1994, 671(1-2), 259-264
267. F. Mashige, Y. Matsushima, C. Miyata, R. Yamada, H. Kanazawa, I. Sakuma, N. Takai, N. Shinozuka, a. Ohkubo, K. Nakahara: *Simultaneous determination of catecholamines, their basic metabolites and serotonin in urine by high-performance liquid-chromatography using a mixed-mode column and an 8-channel electrochemical detector*. Biomedical Chromatography 1995, 9(5), 221-225
268. T. H. Huang, J. Wall und P.Kabra: *Improved solid-phase extraction and liquid-chromatography with electrochemical detection of urinary catecholamines and 5-S-L-cysteinyl-L-dopa*. Journal of Chromatography 1988, 452, 409-418
269. Y. P. Chan und T.S. Siu: *Simultaneous quantitation of catecholamines and O-methylated metabolites in urine by isocratic ion-pairing high-performance liquid chromatography with amperometric detection*. Journal of Chromatography 1988, 459, 251-260
270. E. Brandsteterova, P. Kubalec, K. Krajnak und I. Skacani: *SPE-HPLC determination of catecholamines using an affinity principle*. Neoplasma 1996, 43(2), 107-112
271. E. Hollenbach, C. Schulz und H. Lehnert: *Rapid and sensitive determination of catecholamines and the metabolite 3-methoxy-4-hydroxyphen-ethyleneglycol using HPLC following novel extraction procedures*. Life Sciences 1998, 63(9), 737-750

272. E. Brandsteterova, P. Kubalec, I. Skacani und I. Balazovjeh: *HPLC-ED determination of catecholamines and their metabolites in urine*. Neoplasma 1994, 41(4), 205-211
273. J. M. S. Mallols, J. R. T. Lapasio, R. M. V. Camanas und G. R. Ramos: *Determination of catecholamines in urine by micellar liquid-chromatography with coulometric detection*. Chromatographia 1994, 39 (9-10), 591-596
274. G. Grossi, A. M. Bagossi, C. Lucarelli, R. Paradisi, C. Sprovieri und G. Provieri: *Improvements in automated analysis of catecholamine and related metabolites in biological samples by column-switching high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography 1991, 541(1-2), 273-284
275. G. Santagostino, S. Preda, M. L. Cucchi und P. Frattini: *Simultaneous measurement of total catecholamines and metanephrines in human urine by liquid-chromatography with coulometric detection*. Farmaco 1991, 46(10), 1217-1223
276. B. M. Eriksson und M. Wikstrom: *Determination of catecholamines in urine by liquid chromatography and electrochemical detection after online sample purification on immobilized boronic acid*. Journal of Chromatography 1992, 593 (1-2), 185-190
277. A. Pastoris, L. Cerutti, R. Sacco, L. De Vecchi und A. Sbaffi: *Automated analysis of urinary catecholamines by high-performance liquid chromatography and on-line sample pre-treatment*. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications 1995, 664(2), 287-293
278. H. Kubo, Y. Umiguchi und T. Kinoshita: *In-line derivatization method for fluorometric-determination of catecholamines by high-performance liquid-chromatography*. Chromatographia 1994, 38 (9-10), 591-594
279. R. Said, D. Robinet, C. Barbier, J. Sartre und C. Huguet: *Fully automated high-performance liquid-chromatographic assay for the analysis of free catecholamines in urine*. Journal of Chromatography-Biomedical Applications 1990, 530 (1), 11-18
280. A. Lund: *Simultaneous fluorimetric determinations of adrenaline and noradrenaline in blood*. Acta Pharmacologica et Toxicologica 1950, 6, 137-146
281. S. Honda, Y. Araki, M. Takahashi und K. Kakehi: *Spectrofluorimetric determination of catecholamines with 2-cyanoacetamide*. Analytica Chimica Acta 1983, 149, 297-303
282. A. M. Hansen, J. Kristiansen, J. L. Nielsen, K. Byrialsen und J. M. Christensen: *Validation of a high performance liquid chromatography analysis for the determination of noradrenaline and adrenaline in human urine with an on-line sample purification*. Talanta 1999, 367-379
283. F. A. van der Hoorn, F. Boomsma, A. J. Man in't Veld und M. A. Schalekamp: *Improved measurement of urinary catecholamines by liquid-liquid-extraction*,

- derivatization and high-performance liquid-chromatography with fluorometric detection.* Journal of Chromatography-Biomedical Applications 1991, 563 (2), 348-355
284. F. Boomsma, G. Alberts, F. A. van der Hoorn, a. J. Man in't Veld und M. A. Schalekamp: *Simultaneous determination of free catecholamines and epinine and estimation of total epinine and dopamine in plasma and urine by high-performance liquid-chromatography with fluorometric detection.* Journal of Chromatography-Biomedical Applications 1992, 574 (1), 109-117
285. H. K. Jeon, H. Nohta und Y. Ohkura: *High-performance liquid-chromatographic determination of catecholamines and their precursor and metabolites in human urine and plasma by postcolumn derivatization involving chemical oxidation followed by fluorescence reaction.* Analytical Biochemistry 1992, 200 (2), 332-338
286. H. Nohta, E. Yamaguchi, Y. Ohkura und H. Watanabe: *Measurement of catecholamines, their precursor and metabolites in human-urine and plasma by solid-phase extraction followed by high-performance liquid-chromatography with fluorescence derivatization.* Journal of Chromatography-Biomedical Applications 1986, 493 (1), 15-26
287. H. Nohta, T. Yukizawa, Y. Ohkura, M. Yoshimura, J. Ishida und M. Yamaguchi: *Aromatic glycinonitriles and methylamines as pre-column fluorescence derivatization reagents for catecholamines.* Analytica Chimica Acta 1997, 344 (3), 233-240
288. T. Seki, Y. Yanagihara und K. Noguchi: *Determination of free catecholamines in human urine by direct injection of urine into a liquid-chromatographic column-switching system with fluorometric detection.* Journal of Chromatography 1990, 515, 435-440
289. S. Javidan und M. J. Cwik: *Determination of catecholamines in human plasma by HPLC with electrochemical detection.* Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies 1996, 19 (8), 1339-1348
290. B. Green, J. D. Cooper und D. C. Turnell: *An automated-method for the analysis of urinary free catecholamines using ASTED and high-pressure liquid-chromatography.* Annals of Clinical Biochemistry 1989, 26, 361-367
291. T. Soga und Y. Inoue: *Determination of catecholamines in urine and plasma by online sample pretreatment using an internal surface boronic acid gel.* Journal of Chromatography-Biomedical Applications 1993, 620 (2), 175-181
292. M. Radjaipour, H. Raster und H. M. Liebich: *Quantification of urinary catecholamines, their abundant metabolites, and 5-hydroxyindoleacetic acid by high-performance liquid-chromatography and electrochemical detection, using a single mobile-phase and uniform isocratic conditions.* European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry 1994, 32 (8), 609-613
293. K. S. Boos, B. Wilmers, E. Schlimme und R. Sauerbrey: *Online sample*

- processing and analysis of diol compounds in biological-fluids*. Journal of Chromatography 1988, 456 (1), 93-104
294. M. Yamaguchi, J. Ishida und M. Yoshimura: *Simultaneous determination of urinary catecholamines and 5-hydroxyindoleamines by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. Analyst 1998, 123 (2), 307-311
295. K. Kemper, E. Hagemeyer, D. Ahrens, K.S. Boos und E. Schlimme: *Group-Selective Prefractionation and analysis of urinary catecholamines by online HPLAC-HPLC chromatography*. Chromatographia 1984, 19, 288-291
296. E. Hagemeyer, K. S. Boos, E. Schlimme, K. Lechtenböcker und A. Kettrup: *Synthesis and application of a boronic acid substituted silica for high-performance liquid affinity-chromatography*. Journal of Chromatography 1983, 268 (2), 291-295
297. H. Tsuchiya, T. Koike und T. Hayashi: *Online purification for the determination of catecholamines by liquid-chromatography*. Analytica Chimica Acta 1989, 218 (1), 119-127
298. G. Alberts, F. Boomsma, A. J. Man in't Veld und M. A. Schalekamp: *Simultaneous determination of catecholamines and dobutamine in human plasma and urine by high-performance liquid-chromatography with fluorometric detection*. Journal of Chromatography-Biomedical Applications 1992, 583 (2), 236-240
299. Richtlinien der Bundesärztkamer 2003
300. E. Rozet, R. Morello, F. Lecomte, G.B. Martin, P. Chiap, J. Crommen, K.S. Boos, Ph. Hubert: *Performances of a multidimensional on-line SPE-LC-ECD method for the determination of three major catecholamines in native human urine: Validation, risk and uncertainty assessments*. Journal of Chromatography B 2006, 844, 251-260

VERÖFFENTLICHUNGEN, POSTERBEITRÄGE, WORKSHOPS, SEMINARE UND VORTRÄGE IM ZUSAMMENHANG MIT DER VORLIEGENDEN ARBEIT:

1. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos, Dietrich Seidel
Präanalytische Stabilisierung und vollautomatische HPLC-Bestimmung von Katecholaminen im Urin mittels integrierter Probenaufbereitung und elektrochemischer Detektion

13. Doktoranden Seminar, Kloster Banz, 2003, Vortrag, Programm, 13.01.2003

2. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos, Dietrich Seidel
Präanalytische Stabilisierung und vollautomatische HPLC-Bestimmung von Katecholaminen im Urin mittels integrierter Probenaufbereitung und elektrochemischer Detektion

Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft, Doktorandentagung Düsseldorf, 2003, Vortrag,
Tagungsband: V21, 31

3. R. Morello, K.-S. Boos, D. Seidel
A Novel Approach for Sampling and Stabilization of Urinary Marker Molecules Relevant for Clinical-chemical Analysis and Diagnosis

3rd Workshop on Analytical Artefacts in Environmental Analysis and Related Areas
(Artefacta), 2003, Block A: Methodological Artefacts, Vortrag

4. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos, Dietrich Seidel
Standardized Preanalytical Stabilization and Fully Automated On-line SPE-LC-ECD Analysis of Catecholamines in Urine

10th Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis, RDPA 2003, Cogne,
Valle d'Aosta, Italien, 2003, Posterpräsentation, Final Programm & Book of Abstracts, P46,
91

5. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos
Quantification of Catecholamines in Urine or Plasma: Do We have the Ultimate Solution?
14th International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, PBA 2003,
Kissimmee, Florida, USA, 2003, Vortrag

6. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos, Dietrich Seidel
Standardized preanalytical stabilization and fully automated on-line SPE-LC-ECD analysis of catecholamines in human urine and plasma
14th International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, PBA 2003,
Kissimmee, Florida, USA, 2003, Posterpräsentation, Program & Book of Abstract, TP-19

7. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos, Dietrich Seidel
Standardized preanalytical stabilization and fully automated on-line SPE-LC-ECD analysis of catecholamines in urine
EUREGIO, Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Aachen, 2003,
Posterpräsentation, P2

8. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos
Quantification of Catecholamines in Urine and Plasma: A fully automated on-line SPE
analysis with ECD HPLC
HPLC & SPE in Diagnostics and Therapeutic Monitoring, Prag, Tschechien, 03.11.2003,
Vortrag

9. Morello R., Boos K.-S., Seidel D.
*Standardized Preanalytical Stabilization and Fully Automated On-Line SPE-LC-ECD
Analysis of Catecholamines in Urine*
Eighth International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and
Hyphenated Chromatographic Analyzer, HTC-8, Brugge, Belgien, 2004, Posterpräsentation,
Book of Abstracts, P78, 9

10. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos, Dietrich Seidel
Standardized Preanalytics of Urinary Marker Molecules and On-line SPE-LC-ECD Analysis of Catecholamines in Urine and Plasma

International Symposium on Life Sciences and Computer Technology, LifeCom, Düsseldorf, 2004, Posterpräsentation, Tagungsband, 8

11. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos, Dietrich Seidel
Standardized Preanalytics of Urinary Marker Molecules and On-line SPE-LC-ECD Analysis of Catecholamines in Urine and Plasma

Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft, Doktorandentagung Freudenstadt-Lauterbach, 2004, Vortrag, Tagungsprogramm Abstractband, V68

12. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos, Dietrich Seidel
Standardized Preanalytical Stabilization and Fully Automated On-line SPE-LC-ECD Analysis of Catecholamines in Human Urine and Plasma

The 11th Symposium on Sample Handling for Environmental and Biological Analysis, Baiona/Pontevedra, Spanien, 2004, Posterpräsentation, Abstracts Book, P-46, 101

13. K.-S. Boos, R. Morello, H. Lingemann
Sample Preparation in Bioanalysis: Principles, Automation and Chemical Aspects

15th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, PBA 2004, Florenz, Italien, 2004, Seminar, Abstract Book, Short Course 1, VIII

14. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos, Dietrich Seidel
Standardized Preanalytics of Urinary Marker Molecules and On-line SPE-LC-ECD Analysis of Catecholamines in Urine and Plasma

15th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, PBA 2004, Florenz, Italien, 2004, Vortrag, Abstract Book, 53

15. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos, Dietrich Seidel
Standardized Preanalytics of Urinary Marker Molecules and On-line SPE-LC-ECD Analysis of Catecholamines in Urine and Plasma
2nd Pharmaceutical Sciences World Congress, PSWC 2004, Kyoto, Japan, 2004,
Posterpräsentation, Abstracts Book, P3E-X-018, 395
16. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos, Dietrich Seidel
Standardized preanalytics of urinary marker molecules and on-line SPE-LC-ECD analysis of catecholamines in urine and plasma
7th Symposium on Biomedical-Analytical Sciences, BMAS 2004, Nishinomiya, Japan, 2004,
Vortrag, Abstract Book, A-6, 175
17. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos, Dietrich Seidel
Standardized preanalytics of urinary marker molecules and on-line SPE-LC-ECD analysis of catecholamines in urine and plasma
Trends in Sample Preparation 2004, Seggau Castle, Österreich, 2004, Vortrag, Book of
Abstracts, L-17, 37
18. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos, Dietrich Seidel
Standardized preanalytics of urinary marker molecules and on-line SPE-LC-ECD analysis of catecholamines in urine and plasma
25th International Symposium on Chromatography, ISC 04, Paris, Frankreich, 2004, The
Young Generation, Vortrag, Book of Abstracts, 38
19. Rosa Morello
Pharmaceutical Sciences World Congress
Tagungsbericht PSWC 2004, Pharm. Unserer Zeit, 33. Jahrgang 2004, Nr. 6, 498-499
20. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos, Dietrich Seidel
On-line SPE-LC-ECD analysis of catecholamines in urine and plasma

LaborMedizin & Diagnostik, 2004, 3, 24-25

21. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos, Dietrich Seidel

On-line SPE-LC-ECD analysis of catecholamines in urine and plasma

G.I.T. Laboratory Journal, 2004, 6, 2-3

22. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos, Dietrich Seidel

Standardized preanalytics of urinary marker molecules and on-line SPE-LC-ECD analysis of catecholamines in urine and plasma

1st Pharmaceutical Sciences Fair & Exhibition, PharmSciFair 2005, Nizza, Frankreich, 2005, Vortrag, Book of Abstracts, SC-105

23. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos, Dietrich Seidel

On-line SPE-LC-ECD analysis of catecholamines in urine and plasma and standardization of the preanalytics of urinary marker molecules

29th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, HPLC 2005, Stockholm, Schweden, 2005, Poster, Abstract Book, P10:12

24. Giovanni Maio, Eric Rozet, Rosa Morello, Frank Arnold, Karl-Siegfried Boos

Analysis of endogenous compounds in biofluids with an HPLC system optimized for solid phase extraction coupled with liquid chromatography (On-line SPE-LC)

29th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, HPLC 2005, Stockholm, Schweden, 2005, Poster, Abstract Book, P13:32

25. Rosa Morello

On-line SPE-LC: Vorgehensweise bei der Methodenentwicklung

Summit[®] HPLC Anwendertreffen, Düsseldorf, München, Frankfurt, Leipzig, Vortragsreihe 2005

26. Rosa Morello, Giuly Bringiotti, Giovanni Maio, Frank Arnold, Karl-Siegfried Boos
On-line SPE-LC for bioanalysis using a new, dedicated system
16th International Symposium on Pharmaceutical and Bioanalytical Analysis, PBA 2005, Baltimore, Maryland, USA, 2005, Vortrag L-37, PBA 2005 Abstract - page 26
27. Karl-Siegfried Boos, Rosa Morello
On-line Sample Preparation
16th International Symposium on Pharmaceutical and Bioanalytical Analysis, PBA 2005, Baltimore, Maryland USA, 2005, Short Course, 2005
28. Rosa Morello, Giuly Bringiotti, Giovanni Maio, Frank Arnold, Karl-Siegfried Boos
New Instrumentation and applications for bioanalytical HPLC integrated SPE
4th International Symposium on Separations in the BioSciences, SBS'05, Utrecht, Niederlande, 2005, Poster P806, Symposium Program & Abstracts p. 161
29. Karl-Siegfried Boos, Rosa Morello
LC-MS adequate clean-up of biofluids
4th International Symposium on Separations in the BioSciences, SBS'05, Utrecht, Netherlands, 2005, Workshop, Symposium Program & Abstracts p. 31
30. Rosa Morello, Giuly Bringiotti, Giovanni Maio, Frank Arnold, Karl-Siegfried Boos
On-line SPE-LC in bioanalysis using a novel, tailor-made system
11th Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis, RDPA 2005, Rimini, Italien, 2005, Vortrag, Final Program & Abstracts Book p. 36
31. Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos, Giovanni Maio, Frank Arnold
New instrumentation and applications for bioanalytical on-line SPE
9th International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatography Analyzers, HTC-9 and

8th International Symposium on Advances in Extraction Techniques, ExTech[®] 2006, York, England, 2006, Vortrag

32. Karl-Siegfried Boos, Rosa Morello

Coupling of on-line SPE-LC methods with UV-FD/ECD or MS/MS detectors

9th International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatography Analyzers, HTC-9 and

8th International Symposium on Advances in Extraction Techniques, ExTech[®] 2006, York, England, 2006, Tutorial

33. Eric Rozet, Walthère Dewé, Rosa Morello, Patrice Chiap, Karl-Siegfried Boos, Phillippe Hubert

Transfert d'une méthode de dosage automatisée de 3 catécholamines majeures dans l'urine humaine

Forum LABO & Forum BIOTECH 2006, Paris, Frankreich, 2006, Poster (Rozet)

33. Giovanni Maio, Rosa Morello, Frank Arnold, Karl-Siegfried Boos

Analysis of antimycotics drugs in biofluids by on-line SPE-LC

30th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, HPLC 2006, San Francisco, USA, 2006, Poster, Abstract Book, P610

34. Frank Arnold, Frank Steiner, Giovanni Maio, Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos

A Systematic Approach to On-Line SPE-LC Method Development

30th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, HPLC 2006, San Francisco, USA, 2006, Vortrag (Arnold)

35. Eric Rozet, Rosa Morello, Walthère Dewé, Patrice Chiap, Bruno Boulanger, Karl-Siegfried Boos, Jacque Crommen, Philippe Hubert

Transfer of a Multidimensional On-line SPE-LC-ECD Method for the Determination of Three Major Catecholamines in Native Human Urine

30th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, HPLC 2006, San Francisco, USA, 2006, Poster, Abstract Book, P434

36. Karl-Siegfried Boos, Rosa Morello

Coupling of on-line SPE-LC methods with UV, ECD, FD or MS/MS detectors

12th Symposium on sample Handling for Environmental and Biological Analysis, Zaragoza, Spanien, 2006, Seminar, Book of Abstract p. 4

37. Karl-Siegfried Boos, Rosa Morello

LC/MS adequate clean-up of biofluids

23rd LC/MS Montreux Symposium, Montreux, Schweiz, 2006, Short Course

38. Karl-Siegfried Boos, Rosa Morello

Coupling of SPE with LC-MS

23rd LC/MS Montreux Symposium, Montreux, Schweiz, 2006, Tutorial

39. E. Rozet, R. Morello, F. Lecomte, G. B. Martin, P. Chiap, J. Crommen, K.S. Boos, Ph. Hubert

Performances of a multidimensional on-line SPE-LC-ECD method for the determination of three major catecholamines in native human urine: Validation, risk and uncertainty assessments

Journal of Chromatography B 844 (2006) 251-260

40. E. Rozet, W. Dewé, R. Morello, P. Chiap, E. Ziemons, K.S. Boos, B. Boulanger, Ph. Hubert

Gestion du risque lors du transfert de méthodes analytiques –Cas d'une méthode bioanalytique

7^{ème} congrès francophone de l'AfSep sur les sciences séparatives et les couplages, SEP'07, Grenoble, Frankreich, 2007, Vortrag (Rozet), Poster Ref.35

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name **Rosa Morello, geb. Parafioriti**

Anschrift Tessiner Str. 171
D-81475 München

Geburtsdatum (Ort) 21.07.1973 (Bietigheim-Bissingen)

Schulbildung

09.1981-07.1984 Hillerschule in Bietigheim-Bissingen

09.1984-07.1990 Realschule in Bietigheim-Bissingen, Abschluss: Mittlere Reife

09.1990-06.1994 Wirtschaftsgymnasium in Bietigheim-Bissingen, Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

09.1994-02.1995 Studium der Chemie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

04.1995-07.1996 Studium der Pharmazie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

09.1996-04.2000 Weiterführung des Pharmaziestudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Staatsexamen

03.1998 Pharmazeutische Prüfung: 1. Abschnitt

04.2000 Pharmazeutische Prüfung: 2. Abschnitt

07.2001 Pharmazeutische Prüfung: 3. Abschnitt

08.2001 Approbation als Apothekerin

Praktische Tätigkeiten

09.1995-10.1995	Famulatur in der Sonnen-Apotheke, Neckarsulm
08.1996-09 1996	Studentische Hilfskraft am Institut für Pharmazie, Universität Würzburg
03.1998	Studentische Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Biologie, LMU München
08.1998	Zusatzpraktikum in der Krankenhausapotheke Sterzing (Südtirol)
05.2000-10.2000	Pharmaziepraktikum in der St. Hubertus Apotheke, München
11.2000-04.2001	Pharmaziepraktikum im Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern, München
11.2000-04.2001	stundenweise tätig als Pharmaziepraktikantin in der St. Hubertus Apotheke, München
08.2001-03.2004	stundenweise tätig als Chefvertretung, Helios-Apotheke, München

Promotion

seit 08.2001	Wissenschaftliche Angestellte (Doktorandin) am Institut für Klinische Chemie, Klinikum der Universität München im Arbeitskreis des Laboratorium für BioSeparation von Herrn Professor Dr. Dr. Karl-Siegfried Boos
--------------	---