

本篇介绍使用高效液相色谱(HPLC)和电化学检测器(ECD)来分析儿茶酚胺。

生物体内被熟知的儿茶酚胺有三种，去甲肾上腺素，肾上腺素，多巴胺，它们作为神经递质和肾上腺髓质激素起重要作用。它们在尿中的浓度可用于各种疾病的诊断和治疗起着作用。

在本篇分析中，使用用于预处理的固相萃取小柱MonoSpin PBA与HPLC-ECD。其结果是，可以简单地用高灵敏度和高选择定量尿中所含的儿茶酚胺。另外，由于在ECD的作用电极上使用导电性钻石电极，所以每次测量后可以在线进行电极洗净，这也是这个方法的另一个很显著的特点。（C. Aoyama）

样品注射后15分钟至16分钟之间把电位设定为+4000 mV。通过这样的设置，在每次测量之后可以自动清洁电极表面。

标准溶液测定例

1. Norepinephrine (NE)
2. Epinephrine (E)
3. 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA, I.S.)
4. Dopamine (DA)
100 ng/mL each in 0.1 % Acetic acid solution

3种儿茶酚胺的标准曲线

HPLC条件

色谱柱 : Inertsil ODS-4 (5μm, 250×3.0 mm I.D.)
流动相 : A) Acetate-citrate buffer※
B) CH₃CN
A/B = 100/16, v/v (Premix)
流速 : 0.5 mL/min
色谱柱温度 : 35 °C
检测器 : ECD 800 mV vs. Ag/AgCl (ED703, Diamond)
注入量 : 20 μL

※ Acetate-citrate buffer:
向500mL水中加入0.82g乙酸钠(无水), 0.2g柠檬酸(一水合物)2.10g, 和0.5克1-辛烷磺酸钠。

GL Sciences LC Technical Note

ECD检测器电位和峰面积值的关系

1400mV的值为100%时的相对峰面积

施加电位 (mV vs. Ag/AgCl)

NE, E, DA, DHBA, DHMA, DOPA, DOPAC

通过将电位设定为+ 800mV, 可以减少存在于生物体内的其他具有儿茶酚环的化合物的峰，从而可以选择性地检测出儿茶酚胺。

电位设置为+800 mV的色谱图

a. 3,4-dihydroxymandelic acid (DHMA)
b. 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)
c. 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)
100 ng/mL each (including CAs) in 0.1 % acetic acid solution

电位设置为+1400 mV的色谱图

GL Sciences LC Technical Note

用MonoSpin PBA 进行尿样的前处理

MonoSpin系列是使用具有均匀孔的，使用二氧化硅整体型硅胶的前处理小柱。具有高空隙率的二氧化硅整体型硅胶作为载体，所以通过使用离心机可以简单的操作样品的纯化，浓缩等步骤。

此次使用的MonoSpin PBA，是以苯基硼酸作为官能团与二氧化硅表面键合，并且可以选择性地保留具有顺式二醇的化合物。此外，在回收时，通过使酸性溶液通过小柱，可以容易地洗脱儿茶酚胺。

操作方法例

平衡化 吸附 淋洗 洗脱

用离心操作

儿茶酚胺纯化步骤

将废液管连到MonoSpin PBA
↓ + ①洗脱溶剂200μL
离心*
↓ + ②淋洗溶剂200μL
离心
↓ + 尿样品 200μL
↓ + ③结合溶剂 50μL
离心
↓ + ②淋洗溶剂200μL
换上回收管
↓ + ①洗脱溶剂 200μL
离心
将回收的溶液注入HPLC系统

* 离心都按照10,000 g, 1分钟操作。

MonoSpin系列产品线

MonoSpin C18 $-(CH_2)_{17}CH_3$ 结合十八烷基，具有非极性相互作用。 非常适用于从生物样品中提取药物以及用于脱盐和浓缩肽样品。	MonoSpin SAX Cl^- $-(CH_2)_3-N^+(CH_3)_3$ 与三甲基氨基丙基键合。它结合了强阴离子交换作用和弱非极性相互作用。 非常适合提取酸性药物。。
MonoSpin NH₂ $-(CH_2)_3-NH_2$ 结合氨基丙基。它具有很强的阳离子交换效应和非极性相互作用。 非常适合提取碱性药物。	MonoSpin PBA (本文中所使用的) NH $B(OH)_2$ 它是使用苯基硼酸作为官能团的具有高结合特异性的小柱。适用于选择性萃取含顺式二醇的化合物，如儿茶酚胺。
MonoSpin SCX $-(CH_2)_3-C_6H_4-SO_3^-$ 丙基苯磺酸结合柱。它具有很强的阳离子交换效应和非极性相互作用。 非常适合提取碱性药物。	MonoSpin TiO₂ TiO_2 它是涂有二氧化钛的小柱。非常适合用磷酸基团提取化合物。

GL Sciences LC Technical Note

<测定尿液时的色谱图>

没有做前处理的情况 检测出许多杂质，测定非常困难。

使用MonoSpin PBA的情况 从纯化的结果来看，杂质基本都被去除了。另外，此时的DHBA的回收率在96.4%。

添加标准曲线

峰面积值的C.V.值(n=4)

NE	2.4 %	添加标准曲线的定量结果(ng/mL)	49.0
E	6.9 %		25.9
DA	0.8 %		85.5

分析色谱柱 : Inertsil ODS-4 (5μm, 250 x 3.0 mm I.D.)
Cat.No. 5020-03926

检测器: 电化学检测器 ED703
Cat.No. 6001-70300

※ 本篇技术指南是在东京大学大学院药系研究科的角田誠的指导和帮助下完成的。