

HPLC-ECD 检测尿儿茶酚胺方法的优化^①

廖 瑛^② 单济川 余斌杰

(中山医科大学附属第一医院内分泌研究室,广州,510089)

提 要 本文介绍自制氧化铝微柱提取样品,改良洗脱条件与流动相比,用高效液相色谱分离及电化学检测器(HPLC-ECD)分析尿儿茶酚胺。去甲肾上腺素、肾上腺素、多巴胺的回收率分别为 91.2%、80.7%和 110.9%,线性范围 3.3~3 333 $\mu\text{mol/L}$,批内和批间变异系数均 $<5\%$ 。此法简便、经济、快速、特异性强、回收率高,便于临床和实验室推广应用。

关键词 儿茶酚胺; 高效液相色谱-电化学检测; 氧化铝微柱

中图分类号 O657.72

儿茶酚胺类(Catecholamines, CA)化合物,主要包括肾上腺素、去甲基肾上腺素和多巴胺。尿中 CA 的含量不仅可作为嗜铬细胞瘤的诊断根据^[1],而且可应用于其他与儿茶酚胺有关疾病的研究,因此对其检测方法的研究具有重要意义。传统的荧光法与新近发展的放射酶学测定法(Radioenzymatic Assay)、放射免疫测定法(Radio-immunassay, RIA),或步骤繁琐,或价格昂贵,不易实现。用高效液相色谱-电化学检测法(HPLC-ECD)测定人尿儿茶酚胺,国内外已有不少报道,其所采用的提取方法多为氧化铝和凝胶吸附法,以及溶剂萃取法等。但传统的吸附法回收率低,萃取法试剂来源不易。作者参照 Petr^[2]方法自制氧化铝微柱,并将洗脱条件等加以改良,具有操作简便、易行、快速、回收率高的优点。

1 材料与方 法

1.1 仪 器

Waters 高效液相色谱系统包括 510 泵、460 电化学检测器、U6K 进样器及 810 数据处理色谱工作站。

1.2 试剂与标准溶液

1.2.1 重酒石酸肾上腺素(L-epinephrine bitartrate, E) 重酒石酸去甲基肾上腺素(L-

norepinephrine bitartrate, NE), 盐酸多巴胺(dopamine hydrochloride, DA), 二羟基苄胺(2,3-dihydroxybenzylamine, DHBA), 辛基磺酸钠(SOS), 均为美国 Sigma 厂出品。氧化铝(进口分装), 甲醇、柠檬酸、乙酸钠、乙二胺四乙酸钠(EDTA- Na_2)、乙酸乙酯、浓盐酸(HCl)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)等均为国产分析纯或色谱试剂。

1.2.2 标准溶液 准确称取 E、NE、DA, 用 0.1mol/L HCl 配制成 200 $\mu\text{mol/L}$ 的混合标准溶液, -30°C 贮存, 应用液用 0.1mol/L 的 HCl 稀释为 2.00 $\mu\text{mol/L}$; 同法称取 DHBA, 配制成 200 $\mu\text{mol/L}$ 的内标准溶液, -30°C 贮存, 应用内标准液为 20.0 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2.3 Tris 缓冲液 2mol/L Tris 和 2% EDTA- Na_2 组成, 用 HCl 调节 pH=8.80。

1.2.4 氧化铝的活化 参照 Anton 等方法^[3], 称 100g 氧化铝于 1 000ml 烧杯中, 加 2 mol/L HCl 500ml, 90°C 搅拌 45min, 冷却, 弃上清液及悬浮粒; 加 2mol/L HCl 250ml, 70°C 搅拌 10min, 冷却, 弃上清液及悬浮粒, 共两次; 加 2 mol/L HCl 500ml, 50°C 搅拌 10min, 冷却, 弃上清液及悬浮粒; 反复用纯水, 200ml/次, 洗涤至 pH \approx 3.4。将氧化铝转至蒸发皿, 120°C 烤 1h, 200°C 烤 2h, 冷却后在室温下干燥贮存。

① 本课题由学校科研基金资助

② 第一作者, 30 岁, 男, 实习研究员

1.3 色谱条件

反相色谱柱;150×3.9mm,5 μ m 直径粒子(Nova-Pak C18,Waters)。流动相:由乙酸钠(0.0325mol/L)、柠檬酸(0.02mol/L)、SOS(0.693 mmol/L)和 EDTA-Na₂(0.67mmol/L)组成的混合缓冲液,其与甲醇之比为 92:8,pH=4.0,0.22 μ m 滤膜过滤,超声脱气 10min。玻璃碳电极为工作电极、Ag/AgCl 电极为参比电极、不锈钢电极为对电极,工作电压 650mV,流速为 1.0ml/min。

1.4 样品收集

在容器中加入 10ml 浓 HCl 作防腐剂,收集 24h 尿液,记录尿量,混匀,取少量(10ml)置 4℃,用于测定,或置 -30℃ 长期保存。

1.5 分析步骤

1.5.1 尿液预处理 上述尿液 2.0ml,加乙酸乙酯 2.0ml,振荡 3min,离心,弃上层,共两次。

1.5.2 分析 取 300 μ l 加样器吸头,加 30mg 活性氧化铝,上下用少许人造丝固定,制成上口直径 2.46mm,长 1.2cm 的锥状氧化铝微柱。吸预处理后尿液 300 μ l,加纯水 1.0ml、20.0 μ mol/L DHBA 应用内标准 300 μ l,最后加 Tris 缓冲液 0.5ml,混匀,滴加到氧化铝微柱上,用蠕动泵吸出液体(0.3ml/min)。然后用 2ml 纯水洗微柱,用滤纸吸干残余水分,垂直固定微柱,加入 300 μ l 0.1mol/L HCl 洗脱液,自然流出,最后用加样器稍加压力压出余液,混匀,进样 50 μ l。每批样品同时做两个标准校正。以混合应用标准液 300 μ l 取代尿样品,按上述方法处理,用内标法,按峰面积计算进样浓度,结果按公式计算:

$$24\text{h 总量 } S = \frac{(\text{CA/DHBA})_{\text{样品管}}}{(\text{CA/DHBA})_{\text{标准管}}} \times C_{\text{标准}} \times 24\text{h 尿量}$$

注: $C_{\text{标准}}$ 为标准的进样浓度

2 结果与讨论

2.1 氧化铝微柱的鉴定

2.1.1 氧化铝的加入量与回收率的关系

微柱中氧化铝的加入量,对 CA 的提取有很大影响,是提高儿茶酚胺回收率的重要步骤。当用 0.1 mol/L HCl 300 μ l 洗脱时,氧化铝的加入量在 20mg 以下,不能完全吸附 CA;而氧化铝的加入量在 40mg 以上时,吸附的 CA 则又不能洗脱完全;在 20~40mg 范围内,提取率基本稳定(81.5%~90.6%(图 1))。

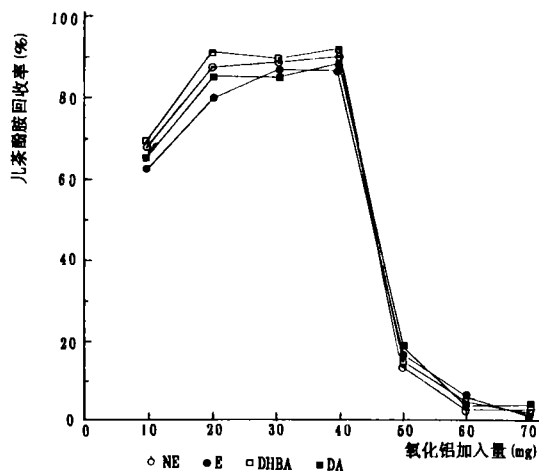


图 1 氧化铝加入量与儿茶酚胺回收率的关系

2.1.2 洗脱液的影响 洗脱液 HCl 的浓度高于 0.3mol/L 时,尿样中的许多干扰物质与 CA 一起被洗下,影响测定结果,浓度低于 0.02mol/L 时,被吸附的 CA 不能完全洗脱;降低回收率;用 0.1mol/L HCl 300 μ l,得到较好的效果。

2.2 最佳流动相的选择

2.2.1 pH 值的影响 随 pH 值上升,CA 的保留时间延长,在 pH4.0 左右时,其保留时间又开始缩短,在 pH4.2 以上,基本不受 pH 影响(图 2)。可能与物质的反离子作用和溶化剂作用的强弱改变有关。pH 值过高时,CA 易氧化,pH 值太低又不能完全分离。在 pH 值 4.0 时,虽然其保留时间稍长,但有最好的分离效果。

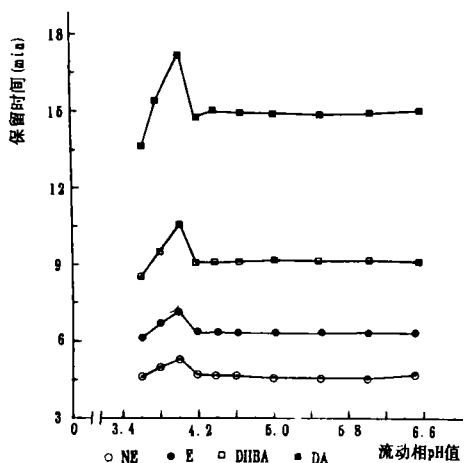


图 2 流动相 pH 值与保留时间的关系

2.2.2 甲醇的影响 甲醇的含量的改变,影响 CA 的保留时间(图 3)。甲醇含量增加,CA 的保留时间缩短,含量太高时,CA 不能完全分离,浓度太低,CA 的保留时间长,延长平衡时间,且峰宽增加。甲醇在 8%,流动相流速 1.0ml/min 时有理想的分离效果。

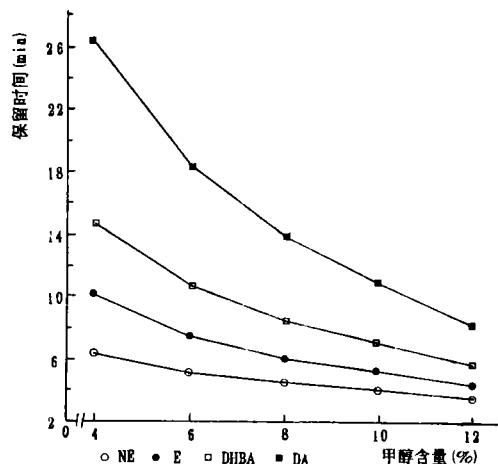


图 3 甲醇含量与保留时间的关系

2.2.3 SOS 的影响 流动相中加入 SOS,与质子化的 CA 形成离子对,保留时间延长(图 4)。SOS 浓度太高,CA 的保留时间过长,延长平衡时间,且峰宽增加,SOS 浓度为 0.693mmol/L 时得到满意的分离效果。

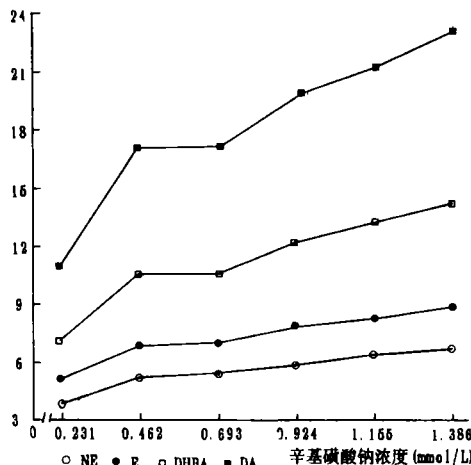


图 4 辛基磺酸钠浓度与保留时间的关系

2.3 线性范围、检测限、回收率及重现性

2.3.1 线性范围和检测限 本系统对于 CA 在 3.333~3 333nmol/L 有良好的线性关系,NE、E、DA 浓度与电流响应值的相关系数分别为 0.9998、0.9997、0.9993, r 均 > 0.999。检测限:仪器稳定状态下,以 S/N=3 为检测限测得,NE=11pg, E=15pg, DA=33pg。

2.3.2 重复性和回收率 重复性:取同一尿标本分多次在同日或不同的试验日测定,得方法重复性:批内变异系数(n=6)为 2.2%~4.6%;批间变异系数(n=6)为 2.7%~4.9%。回收率:取 4 份混合尿样,分别加入 2.00μmol/L 标准应用液 0, 50, 100, 200μl, (加入标准量分别为 0, 1.0, 2.0, 4.0pmol) 混匀,按尿液分析步骤测定 CA 含量。将所测得含量与加标准 0μl 样品含量的差值比对应加入标准量得方法回收率;其中 NE 的,回收率为 86.7%~93.8%;E 的回收率为 80.2%~81.0%;DA 的回收率为 104.8%~115.5%。

2.4 尿样品测定结果

用本法测定了 19 例正常人尿标本(男 12 例,女 7 例)结果,24h 尿 NE=0.175 ± 0.098 (0.061~0.473), E=0.055 ± 0.027

(0.016~0.109), DA=1.60±0.42(0.93~ 表。

2.59)μmol;与国内外文献^[1,4,5]相符。见附

附表 正常人尿 CA 测定结果 μmol/24hr 尿

	本文报告 (n=19)	文献 ^[1] (n=97)	文献 ^[4] (n=22)	文献 ^[5] (n=18)
NE	0.061~0.473	0.0828~0.473	0.0697~0.303	0.060~0.654
E	0.016~0.109	0.0273~0.109	0.0284~0.102	0.010~0.202
DA	0.93~2.59	0.425~2.61	1.15~5.45	0.282~2.33

在临床尿样品分析中,检测嗜铬细胞瘤患者3例,尿CA显著高于正常人,原发性高血压患者也高于正常人。

参 考 文 献

- 1 Thomas P, Nai-Siang J, Gertrude M, et al. Analysis for urinary catecholamines by liquid chromatography with amperometric detection; methodology and clinical interpretation of results. *Clin Chem*, 1979, 25(2): 256
- 2 Petr H, Jitka M, Gertruda H. Determination of plasma catecholamines via condensation with diphenylethylenediamine; simplification of the procedure. *J Chromato Bio Appl*, 1990, 533 :

166

- 3 Anton A, Sayre D, A study of factors affecting the aluminum oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamine. *J Pharmacol Exp Ther*, 1962, 138 : 360
- 4 袁倚盛,赵飞浪,杨巷菁,等. 双柱双泵高效液相色谱-电化学检测法测定尿中儿茶酚胺. 色谱, 1987, 5(5) : 311
- 5 Peaston R. Routine determination of urinary free catecholamines by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromato*, 1988, 424 : 263

(1993-10-05 收稿 1994-03-04 修回)

OPTIMIZATION OF DETERMINATION OF URINARY CATECHOLAMINES WITH HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOPGRAPHY-ELECTROCHEMICAL DETECTION

Liao Ying Shan Jichuan Yu Binjie

(Endocrinology Research Unit of First Affiliated Hospital Sun Yat-Sen
University of Medical Sciences, Guangzhou 510089)

A simple procedure of human urinary catecholamine using high performance liquid chromatography-electrochemical detection is described. Samples were extracted with microcolumn of aluminum oxide made by ourselves. Eluate conditions were improved and proportions of mobile phase were adjusted. The recoveries of norepinephrine, epinephrine and dopamine were 91.2%, 80.7% and 110.9%, respectively. The linearity range was from 3.3 to

3 333 $\mu\text{mol/L}$. Coefficients of variation within the day and day to day were less than 5%. Our method is simple, economical, specific and recoverable. The results suggest that this procedure is feasible for clinical investigation.

Key words catecholamines; high performance liquid chromatography-electrochemical detection; microcolumn of aluminum oxide

《中山医科大学学报》刊登广告办法

本刊是国家科委批准高等院校、卫生部属医学院校的学术期刊。主要反映中山医科大学学术专长、学术成果。是国内外邮局公开发行、由中山医科大学出版的正式刊物(季刊)。欢迎惠赐广告,广告经营许可证号:穗工商广字 01065 号。

本刊接受刊登广告的具体办法如下:

1. 凡需刊登医院产品、医疗器械产品及其说明介绍和医药卫生书刊广告,应具有省、自治区、市卫生行政部门同意刊登广告的批文。

2. 凡需在本刊刊登广告,可与本刊刘清海联系。

3. “广告”是指在本刊付印的广告。广告原稿必须描绘、缮写清楚,制图清晰。凡需要本刊代设计广告者,费用另计。欢迎客户自行制版交本刊排印。广告内容必须切合商品实际,如发现欠妥之处,本刊有权请来稿单位协商修改。

4. 收费标准:(以人民币结算)

版面(全版)	颜色	国内	海外	彩色
封底	黑白	2500 元	4000 元	另加 1000 元
封 2(封面内页)	黑白	2000 元	3500 元	另加 1000 元
封 3(封底内页)	黑白	1800 元	3000 元	另加 1000 元
内页(半版~1版)	黑白	1600~1800 元	3800 元	另加 1000 元

注:凡登满全年 4 期者,按 90% 优惠收费。

5. 若客户自印广告交来本刊刊登,则需由客户自行设计、印刷、排版后付至本刊,交由本刊安排版面刊登,为不致出现空白版面,自行印广告一律要求印双面,16 开,黑白或彩色均可,自印广告版面设计好后,应先付来样版,待本刊审定后收费。收费标准:每期刊 3500 元,登满全年 4 期按 90% 优惠收费。

6. 双方协议并签定合同后,客户应即付款或汇款。本刊收到来款后即安排付印,广告刊出后即赠当期刊物样本若干份。

7. 本部地址:广州市中山二路 74 号中山医科大学学报编辑部

邮政编码:510089

电 话:7778223-2737