

# 尿儿茶酚胺的高效液相色谱分析<sup>1)</sup>

## ——电化学检测法

林文娟 汤慈美

中国科学院心理研究所,北京

王玉梅

中国科学院生物物理研究所,北京

### 摘 要

本文报道了尿去甲肾上腺素、肾上腺素和多巴胺的高效液相色谱分析电化学检测法。用 Bio-Rex 阳离子树脂处理提取尿中的儿茶酚胺。该法的回收率去甲肾上腺素为  $97 \pm 5\%$ ; 肾上腺素为  $97 \pm 9\%$ ; 多巴胺为  $76 \pm 8\%$  (各进行 5 次测定)。本文同时对不同生理心理状态下尿儿茶酚胺的分泌量进行了液相色谱法测定。

尿儿茶酚胺(CA)一去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)和多巴胺(DA)是医学、生物学和心理学研究领域中的重要指标,其含量的变化与人和动物机体的各种应激状态及许多疾病有关<sup>[1-2]</sup>。目前,国内测定尿儿茶酚胺的主要方法是荧光分光光度法。但荧光分光光度法的准确性和灵敏度都不够理想,且肾上腺素和去甲肾上腺素的分离效果也不甚满意。近年来,国外正迅速发展用高效液相色谱——电化学检测法来分析尿中儿茶酚胺的含量,但制样方法各异,大都十分繁琐<sup>[3-5]</sup>。Moyer<sup>[6]</sup>等介绍的方法,尿样本先用氧化铝吸附儿茶酚胺,用醋酸洗脱。然后再用硼酸凝胶吸附儿茶酚胺,再用硼酸洗脱。须数次调 pH 及水洗、离心等,操作步骤繁多。本文介绍一种简便、快速的尿儿茶酚胺的提取及液相色谱测定法。

## 实 验 方 法

### 一、试剂

去甲肾上腺素(Buebeck & Dolder, Basle 瑞士); 肾上腺素(Echemalog 美国); 多巴胺(Fluka AG, Chem, Fabric Buches 瑞士), 内标准二羟苄胺(DHBA)(Sigma 美国); Bio-Rex70 阳离子交换树脂(Bio-Rad Laboratory 美国); 庚烷磺酸盐(Fluka AG, Chem, Fabric Buches 瑞士); 磷酸二氢钠; 乙二胺四乙酸二钠 甲醇, 冰醋酸, 高氯酸, 硼酸

1) 本文于1986年3月17日收到。

注: 本文于1985年10月参加了第五次全国色谱学术报告会

(均为国产)。所有试剂均为分析纯以上级别。

## 二、试剂配制

### 1. HPLC流动相

流动相配制如下: 0.07M 磷酸二氢钠, 11% 甲醇, 0.065% 庚烷磺酸, 1% 冰醋酸, 0.006% EDTA二钠。配制好的流动相用5.0M NaOH调pH至4.8, 然后净化过滤, 超声除气泡后待用。

### 2. Bio-Rex70树脂的处理

先用3倍于树脂体积的0.5N HCl洗, 然后用蒸馏水洗到pH中性, 再用3倍于树脂体积的0.5M NaOH洗, 再用蒸馏水洗到pH中性, 最后用双蒸水冲洗一遍后保存在50mM醋酸-醋酸钠缓冲液中, pH=6.5。

### 3. 标准品制备

用0.01M 高氯酸分别配制成1 $\mu$ g/ml的去甲肾上腺素, 肾上腺素, 多巴胺及内标准DHBA贮存液(冰箱中可贮存4—6周), 然后再稀释成100ng/ml的使用液。

所有试剂均用全玻璃系统双蒸水配制。

## 三、尿儿茶酚胺的提取

尿样品在pH=3时可贮存在-6 $^{\circ}$ C的冰箱中一月左右。尿样提取步骤如下:

1. 5ml尿内加入15ml 0.1% EDTA二钠。
2. 500ng的DHBA加入到每一尿样本中。
3. 用0.5M NaOH调尿样到pH=6.4—6.6。
4. 1.5g处理好的Bio-Rex70树脂装入直径1.5cm长18cm的玻璃柱内, 约沥干10分钟。然后将样品加入柱子, 流出物弃去。
5. 40ml双蒸水冲洗柱子, 流出液弃去。
6. 5ml 4%的硼酸加入柱中, 从树脂中洗脱出儿茶酚胺。最初两滴洗脱液不要。

## 四、仪器

日立635A高效液相色谱仪; 检测器——LC-4B电化学检测器(Bioanalytical Systems Inc. 美国), 其工作电极: 玻璃碳电极, 参考电极: Ag/AgCl; 分离柱——内径4毫米长250毫米不锈钢柱, 填料为Lichrosorb Rp-18, 粒度10 $\mu$ m. (E. Merck德国), 填充压力为350kg/cm<sup>2</sup>。

## 五、色谱条件

流动相的流速为1.2ml/分, 样品注射量10 $\mu$ l, 检测器电位0.7V, 灵敏度范围1nA, 补偿0.5nA。

# 结果和讨论

## 一、儿茶酚胺标准品及尿样的色谱分离图和保留时间

图1, 图2分别为儿茶酚胺标准品及尿样的色谱分离图。根据标准品图谱中每一组分的保留时间可鉴别尿样中的去甲肾上腺素、肾上腺素及多巴胺。并在未知的尿样中分别加入已知样品来对分离图谱作进一步核对。在每一特定实验条件下, 儿茶酚胺每一组

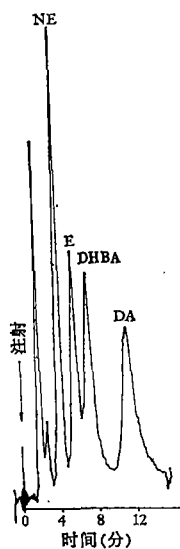


图 1 儿茶酚胺标准品色谱分离图  
10 $\mu$ l 注射量, 内含 NE、E、  
DHBA、DA 各 1ng

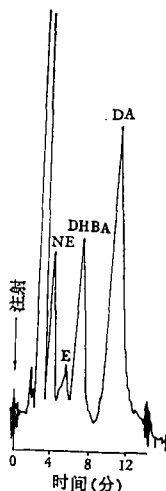


图 2 尿样儿茶酚胺色谱分离图  
10 $\mu$ l 注射量, 内含 DHBA 1ng  
及尿儿茶酚胺

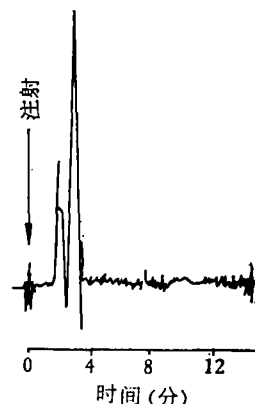


图 3 双蒸水提取液色谱分离图  
(注射量 10 $\mu$ l, 所有提取步骤  
与尿制样本相同)

分的保留时间稳定(在一次实验的 6 个样品分析中, NE 的保留时间为  $3.96 \pm 0.01$  分; E 为  $5.49 \pm 0.05$  分; DHBA 为  $7.01 \pm 0.03$  分; DA 为  $10.69 \pm 0.12$  分)。为确证制样过程中, 无其它试剂杂质峰的干扰, 我们用双蒸水作为空白样品通过整个提取系统, 其硼酸洗脱液的色谱图见图 3。从图 3 看出双蒸水提取液在尿儿茶酚胺的出峰时间内无峰出现。这表明在整个提取系统中不存在其它试剂杂质峰的干扰。实验中我们曾试用三氧化二铝替换 Bio-Rex 树脂, 但发现单纯用三氧化二铝处理的尿样由于杂峰的干扰而不能进行 HPLC 测定。

## 二、儿茶酚胺的标准曲线及回收率

从 0.1ng 到 1ng 的含量范围内, 标准 NE、E 和 DA 的峰高与 DHBA (1ng) 峰高的比值呈良好的线性关系(图 4)。在实际测定中, 10 $\mu$ l 尿样中的 NE 和 E 的含量大约在 0.1ng 到 1ng 的范围内。而多巴胺的最高含量则可能超过 1.2ng 范围, 因而我们对 3ng 范围内的 DA 进行了定量测定, 发现与图 4 中 DA 的标准曲线相符合, 即为该曲线的直线延伸。

本法的回收率 NE 为  $97 \pm 5\%$ ; E 为  $97 \pm 9\%$ ; DHBA 为  $94 \pm 5\%$ ; DA 为  $76 \pm 8\%$  (各进行 5 次测定)。从结果可知, DHBA 的回收率与 NE 和 E 的回收率基本相同, 因而可以从每一样品中 DHBA 的回收率来估计 NE 和 E 的回收率, 据此来计算尿样中的实际含量。本法 NE、E 和 DHBA 的回收率较国外文献的报道值稍高, 而 DA 的回收率则稍低<sup>[9]</sup>。这与我们所用样本制备及测定方法与国外文献报道不全部相同有关。

## 三、不同生理心理状态下尿儿茶酚胺的液相色谱测定值

我们对三名被试进行了应激实验研究。被试在进入实验室前排空膀胱, 然后休息一小时, 收集尿标本一次, 测定结果作为对照值。接着在一定时间压力下要求被试完成颜色一词冲突实验及进行一系列心算, 使被试处于紧张状态下, 实验结束再次收集尿标本一次, 以观察应激后尿内儿茶酚胺排出量的变化。实验结束后休息一小时收集第三个尿标本, 以观察儿茶酚胺排出的恢复情况。结果见表 1。由表 1 可见尿儿茶酚胺在实验应激状态

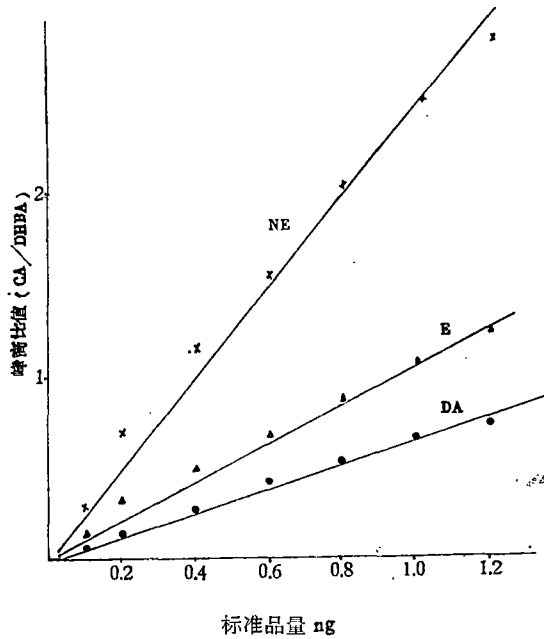


图 4 标准曲线

下分泌量增高, NE 和 E 的增高均达显著水平。实验后休息一小时儿茶酚胺排出量又下降, 但尚未能恢复到实验前休息状态时的水平。这一结果与我们大批数量的荧光分光光度法测定结果一致。但本实验仅用 3 名被试就将三种不同状态下儿茶酚胺排出量的差异清楚地显示出来。这可能与高效液相色谱电化学测定法的高灵敏度及准确性有关。

表 1 不同生理心理状态下尿儿茶酚胺的液相色谱测定值

测试状态	HPLC 测定值(ng/分)		
	NE	E	DA
实验前休息状态	35.0±2.4	5.8±2.7	130.5±51.9
实验应激状态	63.8±16.0*	27.5±9.6*	371.5±221.9
实验后休息状态	49.3±6.9	16.5±9.2	273.7±167.9

注: 所有值为  $\bar{X} \pm S$ ,  $D(n=3)$

\* 与实验前休息状态比  $t$  考验  $P < 0.05$

尿儿茶酚胺含量的计算如下: 根据内标法标准曲线(或外标峰高定量法), 计算出  $10\mu\text{l}$  尿样中 100% 回收率的含量  $A$ , 然后按下列公式计算外周尿儿茶酚胺的分泌量  $X$ , 计算公式如下:

$$X = \frac{A}{10} \left[ \text{每}\mu\text{l尿样中的含量}(\text{ng}/\mu\text{l}) \right] \times 5000 \left( \text{洗脱液总量}(\mu\text{l}) \right) \div 5 \left( \text{用尿量}(\text{ml}) \right) \times \text{尿排出总量}(\text{ml}) \div \text{在体内滞留的时间}(\text{分}) = \text{ng/分}.$$

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Frankenhaeuser M. Behavior and circulating catecholamines. *Brain Research* 1971;31:241—262.
- [ 2 ] Krstulovic AM. Investigations of catecholamine metabolism using high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1982;229:1—34.
- [ 3 ] Moyer TP, et al. Optimized isocratic conditions for analysis of catecholamines by high-performance reversed phase paired-ion chromatography with amperometric detection. *J. Chromatogr.* 1978;153:365—372.
- [ 4 ] Moyer TP, et al. Analysis for urinary catecholamines by liquid chromatography with amperometric detection: methodology and clinical interpretation of results. *Clin Chem* 1979; 25:256—263.
- [ 5 ] Nimura N, et al. Novel post-column derivatization method for the fluorimetric determination of norepinephrine and epinephrine. *J Chromatogr* 1980;221:249—255.

## DETERMINATION OF CATECHOLAMINE IN URINE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH ELECTROCHEMICAL DETECTION

Lin Wenjuan Tang Cimei

*Institute of Psychology, Academia Sinica*

Wang Yumei

*Institute of Biophysics, Academia Sinica*

### Abstract

This report outlines a procedure for the quantitative analysis of urinary norepinephrine, epinephrine and dopamine by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. Bio-Rex cation exchange resin was used to remove catecholamines from urine specimens. The recovery was  $97 \pm 5\%$  for norepinephrine;  $97 \pm 9\%$  for epinephrine;  $76 \pm 8\%$  for dopamine ( $n=5$ ). Meanwhile, a determination was made by HPLC for urinary catecholamines under different psycho-physiological conditions.