

カテコールアミンの分析 (EC法)

超高速高分離能の逆相充填カラムTSKgel Super-ODSを用いた測定ではカラム外での拡がりがある測定結果に大きく影響を与えることから、配管や検出器でのデッドボリュームを最小にすることが望ましい条件の一つです。最も汎用的な紫外可視検出器UV-8020を用いたシステムでのデッドボリュームのカラム効率への影響についてはセパレーションレポートNo. 89に詳細に述べられています。ここでは電気化学検出器EC-8020を検出器に用いたシステムでのSuper-ODSの性能評価について述べます。

EC-8020のセル部の容積は0.5 μ lと小さいのですが、入口側配管には0.25mm I.D. \times 1200mmのテフロン配管が用いられています。これは約59 μ lの容量に相当し、UV-8020の標準セルと同程度の拡がりがあることとなります。これはSuper-ODSを使用するには望ましい条件とは言えません。そこでセルの入口配管を取り替え、カラム効率への影響を調べました。表1に各種配管とカラム効率との関係を示します。

表1 配管 (デッドボリューム) とカラム効率

検出器	UV-8020	EC-8020 (UV-8020の後に接続)		
		0.25mm I.D. \times 1200mm (標準配管)	0.25mm I.D. \times 200mm	0.1mm I.D. \times 400mm (配管キット)
入口配管	0.1mm I.D. \times 400mm (配管キット)	0.25mm I.D. \times 1200mm (標準配管)	0.25mm I.D. \times 200mm	0.1mm I.D. \times 400mm (配管キット)
配管容積	3.14 μ l	58.90 μ l	9.82 μ l	3.14 μ l
理論段数	11398	4749	5594	5770
検出器	-----	EC-8020 (カラム出口に直接接続)		
配管容積	-----	58.90 μ l	9.82 μ l	3.14 μ l
理論段数	-----	7101	8787	9568

このように0.25mm I.D.の配管では短くしても十分な効率は得られません。ところが、0.1mm I.D.の配管 (配管キット) を使用すれば配管キットを装着したUVのマイクロセルで得られるカラム効率に近い性能が発揮できることが判ります。同一の配管キットを用いてもUVで達成されるカラム効率が達成できないのはセル構造に起因しているものと考えられます。

応用例としてカテコールアミンを分離した例を紹介し、カテコールアミンの検出にはジフェニルエチレンジアミンやトリヒドロキシインドール酢酸を反応試薬に用いた蛍光検出がありますが、電気化学検出器を用いるのが最も容易な検出法です。図1に標準カテコールアミンのクロマトグラムを示します。2分以内の短時間でノルエピネフリン (NE)、エピネフリン (E)、ドーパミン (DA) が完全分離されています。また、図2に尿に標準を添加 (各1.5 μ g) したときのクロマトグラムを示します。十分な前処理を施していないためエピネフリンの分離は充分とは言えませんがノルエピネフリン、ドーパミンの分離は充分に達成されています。

※注意事項

EC-8020でもデッドボリュームを最小に抑えれば (配管キットを使用すれば) Super-ODSでの測定が行えるわけですが、配管キットの材質がステンレスの為、下記の点にご注意ください。

- 1) ステンレスは導電性ですので、外部の電気ノイズを拾い易くなります。
- 2) テフロン配管ほどフレキシビリティがありませんので、電極研磨などセルの取り外しに手間がかかります。

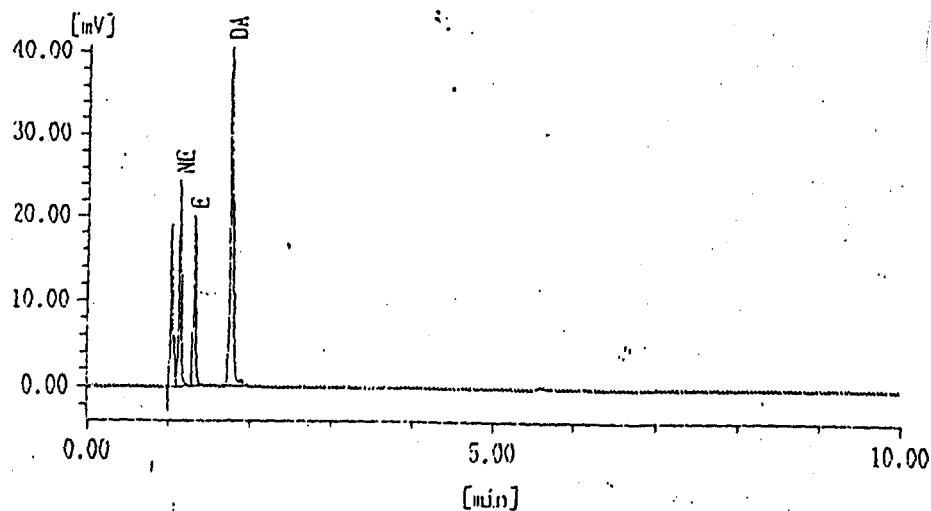


図. 1 標準カテコールアミン (各 2 ng) のクロマトグラム
 カラム : TSK gel Super-ODS (4.6mm I.D. × 10cm)
 溶離液 : 50 mM リン酸緩衝液 + 0.002% EDTA-2Na (pH 2.5)
 流速 : 1.0 ml/min
 温度 : 40°C
 検出 : EC (印加電圧 600 mV)
 注入量 : 1.0 μl

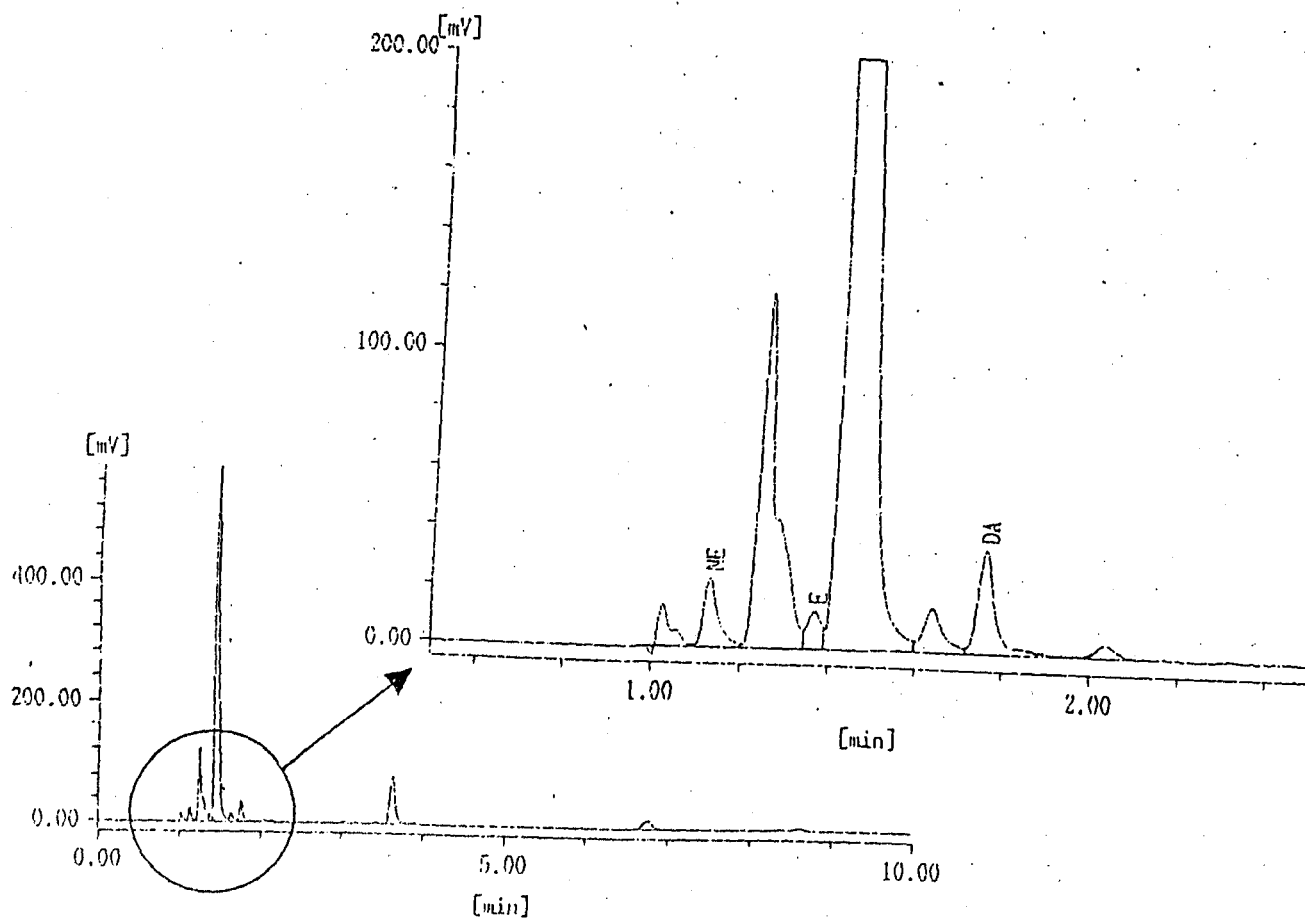


図. 2 尿中のカテコールアミン (各 1.5 ng 添加) のクロマトグラム
 カラム : TSK gel Super-ODS (4.6mm I.D. × 10cm)
 溶離液 : 50 mM リン酸緩衝液 + 0.002% EDTA-2Na (pH 2.5)
 流速 : 1.0 ml/min
 温度 : 40°C
 検出 : EC (印加電圧 600 mV)
 注入量 : 1.0 μl