

カテコールアミンの測定

1. はじめに

生体試料中のカテコールアミン (CA; ノルアドレナリン NA, アドレナリン Adr.) 測定の過程は 2 つに大別される. すなわち, 前処理 (cleanup) と分離定量である.

前処理方法には Anton and Sayre の報告¹⁾ 以来多種多様な方法が用いられているが, authorize されたものはない. 本稿では著者らの確立し得た簡易前処理法²⁾, を紹介する.

CA 分離定量方法には radioenzymatic method³⁾, gas chromatography-mass spectrometry⁴⁾, high performance liquid chromatography (HPLC)-fluorophotometry⁵⁾, HPLC-electrochemical detection⁶⁾ が繁用されている. 今回, CA の分離に HPLC 法を用いた測定システムについて述べ, さらに近年報告された前処理操作を要しない血中⁷⁾および尿中^{7,8)} CA 測定法を紹介する.

2. 前処理方法²⁾

抗凝固剤として EDTA・2 Na を用いて得た患者血漿 1.0ml (尿の場合では 50 μ l) を, EDTA・2 Na 20 mg/ml 含有 0.5 Mtris-HCl 緩衝液 (pH8.7) 2.0ml およびあらかじめ活性化処理した中性アルミナ 100mg の入った試験管に加える. 10分間室温で回転混和後, 水層を除去し, 5ml の脱イオン水で 2 回アルミナを洗浄する. アルミナをマイクロチューブに移し, 15,000 rpm, 1 分間遠心後水分を除く. 0.5M 酢酸 500 μ l を加え, 混和後 20分間室温に放置する. 抽出液 200 μ l を採り, HPLC に導入する. 内部標準物質は用いず, 同時に操作した CA 標準物質を用いて定量値を算出する.

従来より生体試料中の類似化合物からの CA の

選択的分離法として, アルミナ¹⁾や Amberlite IRC-50⁹⁾, CG-50¹⁰⁾, ホウ酸ゲル¹¹⁾を用いる方法が繁用されている. しかし, これらの方法は除蛋白操作や CA の樹脂への吸着のための pH 調整操作を必要とし, 迅速性に欠け日常の分析には不適當である. 著者らはアルミナがカテコール骨格を有する化合物に対する選択性の高い結合力をもつ性質を利用し, 血漿をアルミナと直接反応させることを試み, ルーチン検査に応用し得る可能性を示した. この理由は, 前処理後の CA 分離検出方法の特異性が高い点に負うものと考えられる. すなわち, この測定法の長所を有効に利用することにより, 血漿の除蛋白操作の省略を可能にした. さらにアルミナは pH 8 以上で CA を結合するため, 従来より試料に血漿除蛋白液を用いる際には pH 調整を必須とするが, 本法は緩衝液に血漿を直接添加することで pH の調整は不要である. また本法は高い再現性を有する点より, 個々の被験試料の内部標準を必要とせず, 外部標準を操作ごとに同時に処理するのみでアルミナの回収率補正が可能である. CA に対するアルミナの絶対的回収率は 84~87% 付近と考えられるが, 外部標準を同時に立てることで相対的回収率はほぼ 100% を示す.

3. CA 分離・定量法

CA 分析装置 3 機種を比較を表 1 に示す. 現在, CA の検出方法には蛍光 (trihydroxyindole, THI) 法と電気化学検出 (electrochemical detection, ECD) 法が繁用されている. THI 法は CA を酸化剤で酸化して chrome とし, アルカリ性で転位反応を起こして lutin (trihydroxyindole) を生成させ, その強力な蛍光を測定するものである (図 1). 本法は catechol (3,4-dihydroxyphenyl) 骨格を有する化合物に対して高い特異性

表 1. カテコールアミン測定システム比較表

	島津製作所	日立製作所	柳本製作所
検出原理	蛍光法 (THI)	蛍光法 (THI)	電気化学的検出法 (ECD)
最小検出感度	NA20pg, ADR. 25pg	NA15pg, ADR. 10pg	NA および ADR. 10pg 以下
分析所要時間	25分以内	25分以内	30分以内
分析可能項目	NA, ADR.	NA, ADR.	NA, ADR., Isp., DA, DB.
システム			
HPLC	LC-3A	635A-F	L-3200V
カラム(分離モード)	Zipax-SCX (イオン交換) φ2.1mm×100cm, 40°C	日立ゲル#3011-C (イオン交換) φ2.6mm×25cm, 45°C	ODS-T (逆相) φ4mm×25cm, 室温
溶離液	リン酸緩衝液 0.8ml/min. (50kg/cm ²)	リン酸緩衝液 0.6ml/min(38kg/cm ²)	リン酸緩衝液: メタノール 0.7ml/min (80g/cm ²)
検出器	RF-500LCA Ex. 410nm (10nm slit) Em. 510nm (40nm slit) フローセル容量 120μl	650-10LC Ex. 420nm (20nm slit) Em. 520nm (20nm slit) フローセル容量 90μl	VMD-101A 加電圧 800mV
価格	500万円	500万円	300万円

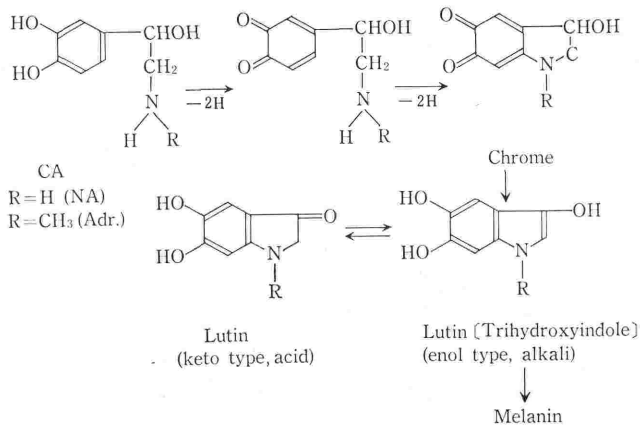


図 1. THI 反応原理

を示す¹²⁾。最小検出感度は NA および ADR. で 10~20pg 程度であり, dopamine (DA) は低感度のため検出不能である。一方, ECD 法は 3 極式ポテンショスタット方式の電位規制電解系においては作用電極, 参照電極, 補助電極の 3 つの電極をセル内に装置して測定が行われる。すなわち, 参照電極の電位を基準として作用電極と補助電極間で定電位電解を行い, 電解液中の電気化学的活性物質が作用電極で酸化(還元)される時に流れる電流を検出して測定するものである。本法は最小検出感度が高い点, および電気化学的活性物質に対し反応を有する点より, 前処理方法を吟味すれば isoproterenol (Isp.) や DA, dobutamine

(DB) などの catechol 誘導体や phenol 誘導体の測定も可能である。

HPLC の分離モードは THI 法では陽イオン交換クロマトグラフィーが, ECD 法では逆相クロマトグラフィーが用いられている。いずれも共存成分からの CA の分離は良好であり著明な差はない。

4. CA 直接分析法

著者らの開発した尿中 CA 測定装置⁸⁾のフローダイアグラムを図 2 に示す。HPLC のグラジエント条件を図 3 に, クロマトグラムを図 4 に示す。本法は前処理操作を行うことなく, 尿を直接

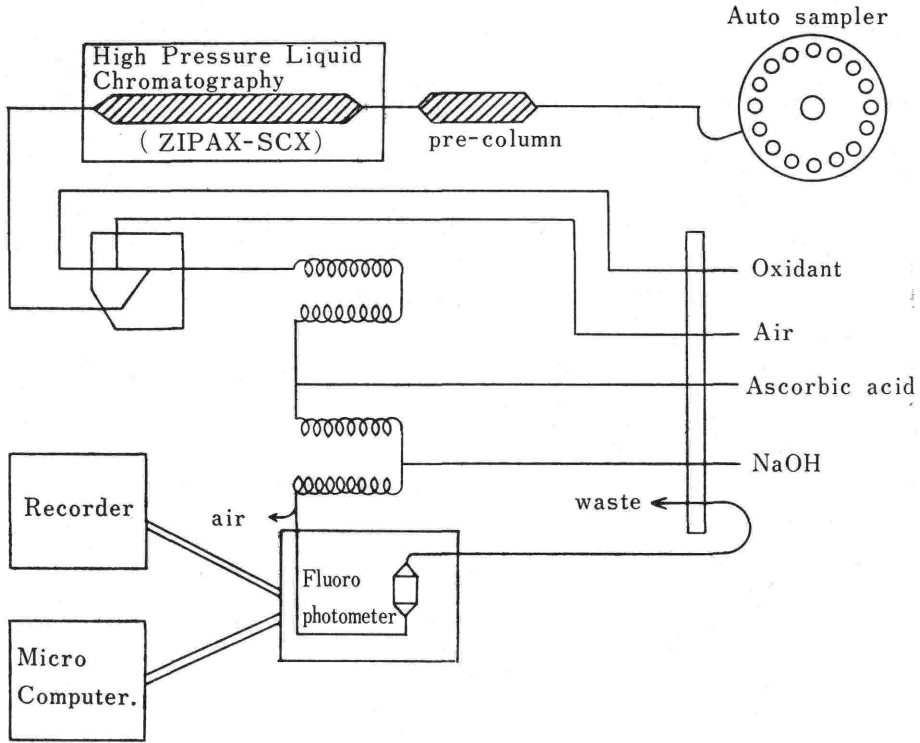


図 2. フローダイアグラム
(文献 8 参照)

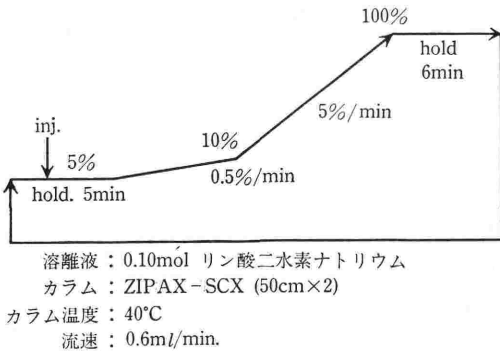


図 3. 勾配溶出条件

HPLC に導入可能で分析所要時間は約 30 分である。その特長は尿を HPLC に導入後きわめて希薄な濃度の溶離液で展開し、陽イオン交換樹脂に吸着されない物質、またはきわめて弱い結合で吸着する中性、酸性 catechol 体などを最初に溶出させる。その後、一定の割合で徐々に溶離液の濃度を増して測定対象の CA を溶出させる点にある。本法を可能にした理由は勾配溶離法により尿中共存成分と CA の分離を改善し、さらに試料量を少

なくした点、および HPLC のメインカラムの前にガードカラムを装置してメインカラムの汚染を防いだ点、個々のサンプルの測定終了後も数分間濃い溶離液を流して洗浄の役目も兼ねさせた点にある。

近年、Yamatodani, A. and Wada, H. はダブルカラムシステムによる全自動定量法⁷⁾を開発した。本法は試料の前処理をプレカラムで行い、測定対象物質分画を分析カラムに導入して THI 法により検出する。フローダイアグラムを図 5 に、クロマトグラムを図 6 に示した。本法は血漿を被験検体とする場合には除蛋白液を、また尿では直接に分析の対象とし得るため、操作の簡便性に優れルーチン分析に適する。本法の検出限界は約 50 f moles (約 10pg)、プール血漿の繰り返し分析による変動係数は ± 3.0 % 以下で、1日に50検体の分析処理が可能である。

5. 結 語

現在繁用されている CA 測定に関する前処理方

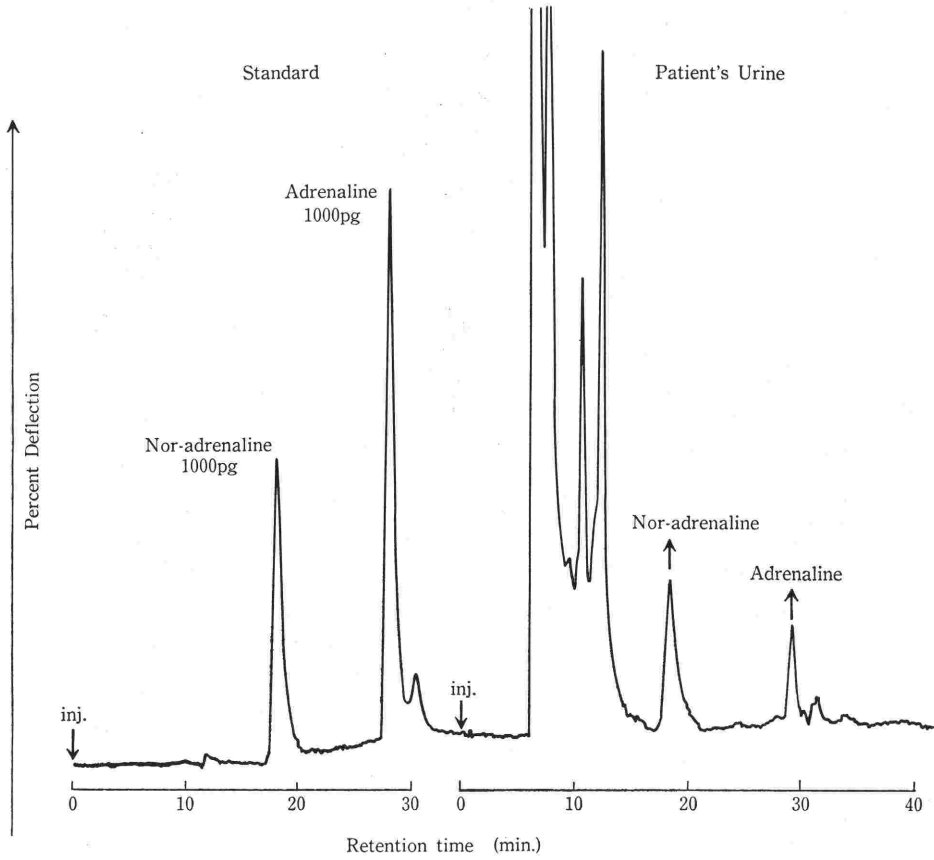


図 4. フローダイアグラム
(文献 8 参照)

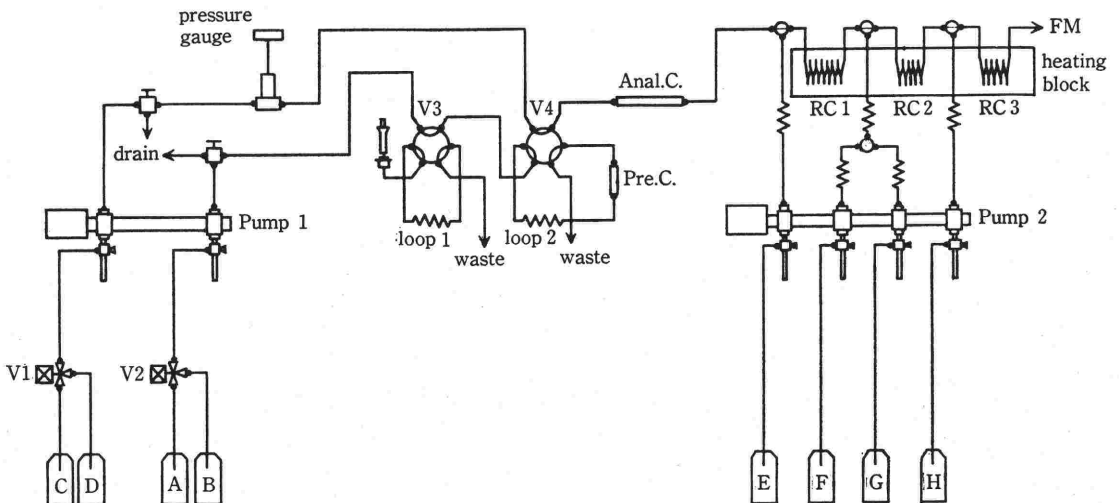


図 5. クロマトグラム
(文献 7 参照)

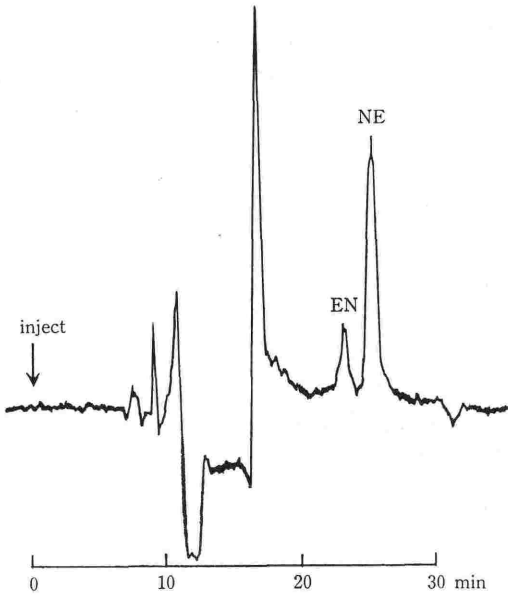


図 6. クロマトグラム
(文献7参照)

法, 分離検出方法について述べた。

今後の問題点は被験検体量の微量化, 分析所要時間の短縮化, 完全自動分析化にあると考える。

文 献

- 1) Anton, A.H. and Sayre, D. F. : A study of the affecting the alminum oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **138**:360~375, 1962.
- 2) 扇谷茂樹, 初田和由, 久城英人, 児玉順三, 岸本康朗, 田中一彦 : 血中カテコールアミン測定の簡易前処理法. *臨床病理* **30**:1251~1254, 1982.
- 3) 永津俊治 : アイソトープによる生理活性 アミンの

測定. *臨床化学* **4**:5~11, 1975.

- 4) 日置長夫, 能登康夫, 細島弘行 : Mass fragmentography による生体カテコラミン分画の簡易同時分析定量法. *日内会誌* **53**:785~796, 1977.
- 5) 守 和子 : カテコールアミンの高速液体クロマトグラフィーによる分析 (第3報) 尿中アドレナリン, ノルアドレナリン, メタネフリン, ノルメタネフリンの分離. *産業医学* **17**:116~117, 1975.
- 6) Moyer, T.P., Jiang, N., Tyce, G.M., Sheps, S. G. : Analysis for urinary catecholamines by liquid chromatography with amperometric detection: Methodology and clinical interpretation of results. *Clin. Chem.* **25**:256~263, 1979.
- 7) Yamatodani, A. and Wada, H. : Automated analysis for plasma epinephrine and norepinephrine by liquid chromatography, including a sample cleanup procedure. *Clin. Chem.* **27**:1983~1987, 1981.
- 8) 扇谷茂樹, 久城英人, 児玉順三 : 高速液体クロマトグラフィーによる尿中カテコールアミンの直接分析法, *臨床化学* **9**:327~332, 1980.
- 9) Seki, T. and Wada, H. : Chromatographic separation of catecholamines on a weakly acidic ionexchange resin. *J. Chromatogr.* **114**:227~231, 1975.
- 10) 大和谷厚, 和田 博 : 生体試料のサンプリングと前処理. *ぶんせき* **20**:842~854, 1978.
- 11) 河合 聡 : 生体アミンの高速液体クロマトグラフィー. *島津科学器械ニュース* **19**:1~19, 1978.
- 12) Kishimoto, Y., Ohgitani, S., Yamatodani, A., Kuro, M., Okumura, F. : Method for the simplified analysis of deproteinized plasma and urinary isoproterenol by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **231**:121~127, 1982.

扇谷茂樹

(国立循環器病センター臨床検査部)