

高速液体クロマトグラフィーによるヒト血漿中

Catecholamine (CA) の測定方法の検討 (第1報)

吉原 富子*・尾関 幸子**・南雲 葉子***・斉藤 芳枝*
山口 功***・三田 禮造****・苫米地孝之助*****・岩淵 等*****

(昭和60年9月30日受理)

Measurement of Plasma Catecholamine Concentration in Man by using HPLC-THI Method (Part 1)

Tomiko YOSHIHARA, Sachiko OZEKI, Yoko NAGUMO, Yoshie SAITO,
Isao YAMAGUCHI, Reizo MITA, Konosuke TOMABECHI and Hitoshi IWABUCHI

(Received September 30, 1985)

緒 言

Catecholamine (以下CAと略す)は、カテコール骨核をもった芳香族アミンで生体内にはdopa, nor-epinephrin (NE), epinephrin (Ep) および dopamin (DA, 以下NE, Ep, DAとそれぞれ略す)の4種類が存在している。NEは中枢神経, 交感神経さらに副腎髄質などに広く分布し神経伝達物質として作用し, Epは主に副腎髄質に存在し血中に分必され心脈管, 平滑筋系や糖・脂質代謝などに関連した広範なホルモン作用を有している。dopa, DAはこのようなNE, Epの前駆体として中枢神経系, 特に大脳基底核などに多く分布している¹⁾。

またCAは日内変動を示すが, 特に交感神経系, 副腎髄質系に影響を及ぼす物質であるNEおよびEpに強い日内変動があると言われている²⁾。

このCAの測定方法として, 酵素アイソトープ法 (REA), ガスクロマトー質量分析法 (GC-MS), 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた trihydroxyindole 蛍光法 (HPLC-THI) さらに HPLC を用いた電気化学検出法 (HPLC-ECD)³⁾ などが用いられている。生体内に微量にしか存在しないCAの定量には高感度な測定方法が必要であるが, 著者らは高速液体クロマトグラフィー (HPLC-THI法, 日立650-10LCシステム655型) を用いてCAの特に

血漿中NEおよびEp含量の測定方法の検討を試みた。

実験方法

1 HPLC-THIの測定条件

HPLC-THI測定方法の原理としてはCAをHPLC (日立システム655型) を用い, dopa, NE, EpならびにDAを溶離液によって分離後, 酸化剤, 強アルカリなどの反応液により酸化閉環し生じた螢光物質である trihydroxyindole を励起波長 (λ_{ex}) 410nm, 螢光波長 (λ_{em}) 520nmにて螢光分光光度計 (日立650-10LC型) で測定する。すなわち溶離液はリン酸1カリウム13.6g, リン酸0.5mlを蒸留水にて1.0ℓとしたものである。反応液はカラムより分離溶出された物質をフェリシアン化カリウムで酸化しさらに水酸化ナトリウムを添加して螢光性のNメチル-3, 5, 6-trihydroxyindole に変える。このとき還元剤としてアスコルビン酸を加え, 過剰の酸化剤を分解する。このような必要性から反応液としてフェリシアン化カリウム15.0mg, リン酸1カリウム2.72g, リン酸2カリウム6.96gを蒸留水にて200mlとしたもの, 水酸化ナトリウム40.0g, アスコルビン酸200.0mgをそれぞれ蒸留水にて200mlとしたものと3種類を用いた。反応液は超音波洗浄器を用いて3分間脱気し, 約8時間を経過すると劣化するのでそのつど調製を行った。

また梶原⁴⁾らの報告よりCAの安定剤としてEDTA-2NaとNa₂S₂O₃の組み合わせがもっとも回収率がよいことから10%Ma₂S₂O₃100μℓ, 6%EDTA-2Na100μℓ用いた。またカラムはセパコール・ミニカラム (生化学工業製) を用い測定値のばらつきを防ぐため充

*食品学第1研究室 **栄養学第3研究室

食品学第3研究室 *公衆衛生学第2研究室

*****公衆衛生学第1研究室

*****日立製作所那珂工場応用技術センター

分に注意して溶出操作を行った。吸着剤である活性アルミナ（和光純薬工業製，CA測定用）を50mg用いて吸着させ至適アルミナ吸着 pHは pH8.5が最大であることから溶出にあたっては酢酸の他にもHClを用いて試みた。

2 標準溶液の調製

標準溶液の組成は100 μ l中，dopa20ng，NE1ng，Ep1ngおよびDA20ngを含むもの（希釈液は希酢酸溶液 Standard solution

150 μ l(dopa30ng,NE3ng,Ep3ng,DA30ng)
add lute water 2,850pl
10% Na₂S₂O₅ 100 μ l
6% EDTA-2Na 100 μ l

Sample 1ml

1.5M Tris-HCL Buffer
(2% EDTA-2Na pH8.6)
0.5M AcOH 150pl
10% Na₂S₂O₅ 50 μ l
Al O 50mg
Shake for 10min.

Alumna elute

Filtration (washing) \times 3
at 2,000rpm for 1 min.
0.5M AcOH 200 μ l
Filtration
at 3,000rpm for 5 min.

HPLC 100 μ l

Fig. 1 The procedure for standard solution.

12:988)である。この150 μ lにつき測定条件の諸点に注意しながらFig 1のフローシートに従い試料の調製を行った。

3 試料前処理および測定方法

試料前処理および測定方法をFig 2に示した。

Blood

Heparin
10% Na₂S₂O₅ 50 μ l
6% EDTA-2Na 50 μ l
at 3,000rpm for 10min.

Plasma 1ml

1.5M Tris-HCL Buffer
(2% EDTA-2Na pH8.6)
0.5M AcOH 150 μ l
10% Na₂S₂O₅ 50 μ l
Al O 50mg
Shake for 10min.

Alumina elute

Filtration (washing) \times 3
at 2,000rpm for 1 min.
0.5M AcOH 200 μ l
Filtration
at 3,000rpm for 5 min.

HPLC 100 μ l

Fig. 2 The procedure for plasma catecholamine determination

1) 試料前処理方法

血液サンプルは血液凝固阻止薬として heparin, 10% Na₂S₂O₅, 6% EDTA-2Naをそれぞれ50 μ l加え遠心分離し，得た血漿を試料とした。

2) 測定方法

測定にあたり分析条件を次のようにして行った。ポンプは日立655A-11形ポンプで溶離液ポンプ流量0.6ml/min，反応ポンプ流量0.3ml/minとしカラムは2.6mm ID \times 150mmL，充填剤として日立ゲル# 3013-Cを用い温度45 $^{\circ}$ Cとした。キャリアは0.1M phosphate buffer，分析圧力10~150kg/cm²，chart speedは5mm/minとした。測定方法はHPLC-THI法の原理でも述べたようにCAをHPLC（日立システム655型）にて分離を行い，酸化剤，強アルカリにより生じた蛍光物質を蛍光分光光度計（日立650-10LC型）を用いて測定した。

実験結果

標準溶液のクロマトグラムおよび分析パラメータをFig 3に示す。

クロマトグラムおよび分析パラメータから測定値とし

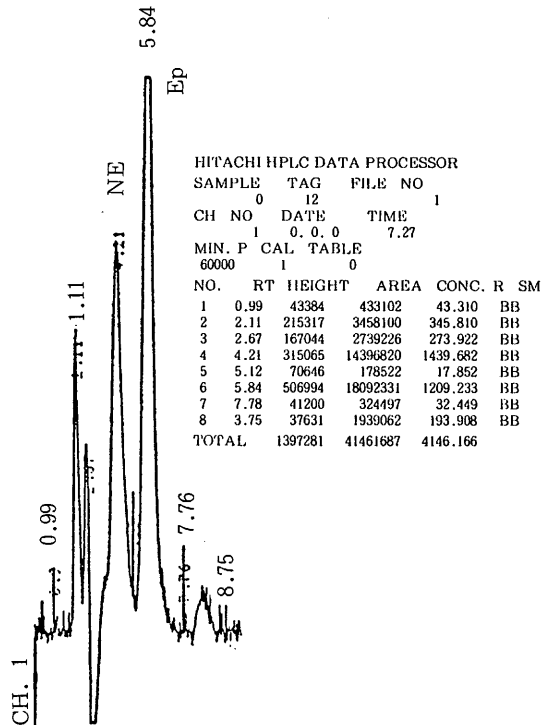


Fig. 3 Chromatogram of CA standard solution.

てNE250pg, Ep250pgが得られた。これはHPLC-THI法が感度も再現性もよく正常範囲内のNE, Epについて測定可能であることを示すものであった。CA溶出にあたりHClでも試みたが酢酸と比較して回収率が低く不適当と思われた。

実際の血漿サンプルの分析結果をFig 4に示す。クロマトグラムおよび分析パラメータよりサンプルの血漿中

dopa, DAについては今後検討の必要性を認めた。

要 約

ヒト血漿中Catecholamine (CA) 特に nor-epinephrin (NE) および epinephrin (Ep) 濃度の測定方法の検討を試み次のような結果を得た。

- 1) カラム (セバコール・ミニカラム) を用いてアルミナに吸着させる際には特に正確に十分に注意をして操作を行うことが測定値のばらつきを小さくすることが言えた。
- 2) HPLC-THI法は感度, 再現性もよく最小必要試料量で測定可能であった。
- 3) 正常範囲内のNE, Epについて測定可能であり, ヒトの血漿NE, Ep濃度測定方法として適していると言えた。
- 4) 測定方法のデメリットとして尿中DAと比較し血漿中のものはピークが判別しにくく濃度を測定しにくいことがあげられ, dopa, DAについては今後検討が必要であることを認めた。

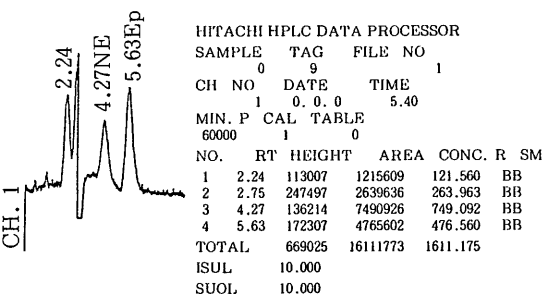


Fig. 4 Chromatogram of plasma catecholamine concentration.

NEは130.08pg/ml, Ep65.85pg/mlであった。従って十分な血漿量を得ることのできるヒトの血漿NE, Ep濃度測定にはもっとも適していると言えた。

考 察

HPLC-THI法についての報告はわずかであるが, 南³⁾らはヒトおよびラットの血漿CAについてREA法, HPLC-ECD法などを用いて検討を行っている。これによると, REA法は感度, 再現性がよくしかも血漿50μlで測定可能とし小動物の血漿CA濃度の測定に適しているとしている。HPLC-ECD法は電位を一定にして電極表面上でCAを酸化しその際生じる電流の差を応用して定量分析する方法であるが, これは誘導体転換を行わずに測定でき操作も簡単でDAが感度よく測定できることもメリットとなっている。しかしながらヒトやラットのNE, EpおよびDAを測定する際には2ml以上の血漿を必要としている。HPLC-THI法は感度も再現性もよくHPLC-ECD法ほど多くの血漿を使用とせず正常範囲内のNE, Epについては測定可能であることが言えた。今回は特にNE, Epを測定したがDAの場合尿中DAと比較し血漿中のものはピークが判別しにくく濃度を測定できにくいという欠点もあり

引用文献

- 1) 金井 泉他: 臨床検査法提要, 金原出版(東京), 1983, p.653.
- 2) 神田 直他: 日本脳卒中学誌, 5. 46 (1983)
- 3) 南 勝他: 日薬理誌, 83. 17 (1984)
- 4) 梶原長雄他: 日内分泌会誌, 57. 1044 (1981)