高速液体クロマトグラフィーと電気化学検出器の 組み合わせによる血漿カテコールアミンの測定方法の検討

駿河台日本大学病院循環器科

梶 原 長 雄, 村 上 彰, 磯 崎 千恵子
北 隆, 小 野 雅 史

An Estimation of Plasma Catecholamines by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection

**Nagao KAJIWARA, Akira MURAKAMI, Chieko ISOZAKI,
Takashi KITA and Masashi ONO**

Department of Cardiology,
Surugadai Nihon University Hospital,
Nihon University School of Medicine

It is known that changes in the concentration of plasma catecholamine are closely related to the sympathetic nerve system and adrenal function. The determination of plasma catecholamine is, therefore, a very useful way to investigate the disorder of catecholamine synthesis and metabolism and also to diagnose certain diseases.

Catecholamine is a substance that exists in body fluids as a very small and labile component. Though several analytical methods of catecholamine are available at present and can be converted to the quantitative determination of plasma catecholamine, nothing has been admitted yet as an established determining method.

In this experiment we attempted to test whether or not a combination of high performance liquid chromatography with electrochemical detection could be used as an efficient method of plasma catecholamine determination.

The results obtained are as follows:

- 1) The effect of stabilizing reagents for the recovery of catecholamine: Five different reagents of a) ascorbic acid b) sodium thiosulfate c) EDTA-2Na d) sodium thiosulfate and e) sodium thiosulfate plus EDTA-2Na, were tested, and the reagent of sodium thiosulfate plus EDTA-2Na was concluded to be the most effective stabilizer among them. Moreover at this combination of the reagent, plasma CA was kept stable under -20°C for 20 days.
- 2) The effect of protein precipitant: Perchloric acid was employed as a precipitant of the plasma protein. Among four different concentrations of 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0N, the 0.5N concentration was disclosed to be the most effective concentration for the recovery of catecholamine in the supernatant.

- 3) The amount of alumina: Three different amounts of alumina (5, 10 and 50mg) were tested, but no difference was observed between 10mg and 50mg. pH dependency of catecholamine adsorption on the alumina: Maximum adsorption was observed at pH 8.5 when the experiments were performed with 0.5M tris HCl buffer.
- 4) The effects of voltage of electrochemical detector on the accuracy of the determination: Among six different voltages from 0.2 to 1.0 tested, 0.6 V was concluded to be the most efficient voltage for the accuracy of determination.
- 5) DHBA as an internal standard of catecholamine: It was determined that DHBA could be used as an internal standard of the catecholamine.
- 6) The comparison between the double isotope method and this method: Results from the two different methods correlated quite well, indicating that the method reported in this paper can be used as a reliable quantitative determination of the plasma catecholamine, though the method seems to have several points that should be improved further.

ま え が き

カテコールアミン（以下 CA と略す）は、情動、刺激、ストレス、運動等によって変動するが、その血漿濃度は採血方法および保存方法などによっても変動することがあるので、一定条件下で採血、保存、測定する必要がある。また CA は生体内に非常に微量にしか存在しておらず、血中に放出された後、速やかに消失する。そのため定量にあたっては、特にその分離・濃縮・精製などに注意を払わなければならないし、同時に高感度の測定法が要求される。

この点について、今まで種々の測定方法が多くの人達によって考案されてきた。1930年 Paget がアルカリ性溶液中でエピネフリンが強い蛍光を発することを見出し、1934年 Shaw¹³⁾ は CA 分離のために吸着剤 alumina を利用することを始め、1968年には Engelman²⁾ 等により、Double Isotope 法が開発された。

一方1950年 Kemula らが始めて高速液体クロマトグラフィー（以下 HPLC と略す）に電気化学検出器（以下 ECD と略す）—— CA の水酸基が電極板上酸化されてキノンになり、この際生じる電流を検出する機械——を組み合わせる方法を発表し、1973年 Kissinger⁷⁾ らが本法を CA の測定に応用した。

今回我々は、HPLC と ECD の組み合わせによる方法で CA を分析する機会を得たので、特に血漿 CA を本法で測定するにあたり、その測定条件、測定方法を考察し、我々の所で行っている Double Isotope^{9) 12)} の変法による測定法と比較検討した。

実 験 方 法

I) 試薬

1) 基準液

epinephrine (E) (Aldrich 製), norepinephrine (NE) (Aldrich 製), dopa (Aldrich 製), dopamine (DA) (Aldrich 製), および内部標準物質である dihydroxybenzylamine (DHBA) (Aldrich 製) は 0.05N の HCl を用い 1 ng/μl および 100 pg/μl 溶液に調整する。基準液は調整後 4℃ で保存する。

2) alumina

Woelm 製の Alumina Woelm N.Akt 1 を使用した。活性化は以下の通りである。

- (I) alumina 100 g に 1N HCl 1L を加え，30 分間煮沸する。
- (II) 加熱した 1N HCl 1L で alumina を洗浄する。
- (III) 約 20 L の脱イオン水で，pH 4.0 附近になるまで水洗する。
- (IV) 蒸留水 1 L で水洗する。
- (V) 120℃，1 時間乾燥する。
- (VI) 200℃，3 時間乾燥する。
- (VII) 乾燥された alumina は，デシケーター中に保存する。

alumina を酸処理するのは酸可溶性の不純物を洗い去り，alumina の吸着能を一定にさせるためであり，さらに水洗で傾瀉を繰り返すことによって alumina の微粒子を除去し，粒子を一定にする⁶⁾。

上記の方法は一般的な alumina の活性化であるが，今回用いる alumina は極微量であるため(I)～(IV)によって得られた活性 alumina 5 g をさらに再蒸留水 5 L を用い水洗し，(V)～(VII)の操作を行い，alumina 粒子の一定化に努めた。

3) EDTA -2 Na**4) Na₂S₂O₃****5) Na₂SO₃****6) heparin sodium****7) ascorbic acid****8) HClO₄****9) HCl****10) 0.5 M pH 8.5 tris HCl buffer**

60.57 g の tris (hydroxymethyl)-aminomethane (M=121.14) を約 900 ml の蒸留水に溶かし 1 N HCl で pH 8.5 に調整後，再び蒸留水を加えて全量を 1 L とする。

11) 0.1 M pH 3.01 phosphate buffer (キャリア用)

0.1M KH₂PO₄ に 1mM EDTA-2Na を加え，H₃PO₄ で pH 3.01 に調整する。その後真空ポンプにて脱気する。

II) 装置**1) 高速液体クロマトグラフィー (抑本，L-2000型)**

ポンプは Rheodyne 製ループバルブインジェクター (100 μl ループ付き) を装備したシングルポンプタイプである。カラムは，長さ 25cm，内径 4.6 mm，オクタデシルシラン (ODS) 粒子 7 μm を充填剤としている。キャリアは 0.1 M pH 3.01 phosphate buffer，流速は 0.8 ml/min，分析圧力は 90～120 kg/cm²，チャートスピードは 0.5 cm/min である。

2) 電気化学検出器 (柳本 ヤナコ VMD 101型)

本検出器は，フローセルタイプの電解セルを用い，作用電極として glassy carbon，参照電極として銀-塩化銀，対極としてステンレス管を使用したものであり，作用電極における電位を参照電極により一定に保ち，作用電極と対極との間の電流を測定するものである。

3) 冷凍遠沈器 (佐久間 マルサン 50B-CFS-3)**4) 凍結乾燥器 (アツベ科学 S型)**

5)液体シンチレーションカウンター (Packard Model 2450 Tri - Card)

6)pH メーター (ToA HM-20E)

III) 方法

CA 測定方法は Fig. 1 に示す通りに検討した。検体に安定剤として Na_2SO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, EDTA-2Na の単体と EDTA-2Na と $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ の組み合わせを用い安定剤の有用性を検討し、次いで除蛋白のため種々の濃度の HClO_4 を加え除蛋白状態を検討した。10000 rpm, 30 分間冷凍遠沈した後, CA の至適 alumina 吸着 pH を検討するため上清を pH 8.0~9.0 に調整し, さらに alumina 量と CA 吸着能力及び alumina の損失による CA 値のバラツキを検討するため 5, 10, 50 mg の alumina を加えた。alumina 洗浄後, 凍結乾燥器に入れ, alumina を乾燥させ, 0.5 N HCl により CA を alumina より溶出させ, 溶出液を HPLC に注入し, その際, 電気化学検出器の電圧を 0.2~1.0V に変化させ, CA 測定至適電位を検討した。また安定剤と保存の関係, DHBA が内部標準物質になりうるか, 及び本測定法のバラツキについても検討した。

Fig. 1. Procedure of catecholamine's analysis.

1)安定剤の検討

a) 安定剤の選択

CA は化学的に不安定な物質であり, 安定剤の選択は CA の回収率に大きく影響すると思われる。一般的 CA の安定剤として用いられているものに, ascorbic acid, Na_2SO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, EDTA-2Na および EDTA-2Na と $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ との組み合わせなどがある。ascorbic acid は Fig. 2 に示す通り, 低濃度でも NE と E の間にピークを生じるため本測定に不適であるとし, Na_2SO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, EDTA-2Na の単体及び, EDTA-2Na と $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ の組み合わせについて検討した。

基準液 1 ng に対し, Na_2SO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, EDTA-2Na は 10 mg を用いた。次いで EDTA-2Na と $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ の組み合わせは 1:10, 1:7.5, 1:5, 5:1, 7.5:1, 10:1 以上 6 通りの比及び 10 mg:10 mg, 50 mg:50 mg, 150 mg:150 mg 以上 3 通りの濃度で比較した。

b) 血漿保存に対する安定剤の役割

CA は放出された後, 速やかに代謝され消失するが, 採血後直ちに測定することは困難である。そのため安定剤と保存の関係を検討した。

安定剤として EDTA-2Na と $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ を加えた物と加えない物とを作り, 各々に血漿 1 ml, 基準液 5 ng を加え, -20°C で凍結し, 5 日ごと 20 日後まで測定した。

Fig. 2. Influence of ascorbic acid to various catecholamine peaks on chromatogram.

Column: nucleosil 7 μ m, 25cm $\times$ 4.6mm I.D.

Mobile phase: 0.1M phosphate buffer (pH3.01)
containing 1mM EDTA-2Na.

Applied potential: 0.5V vs, Ag/AgCl.

Flow rate: 0.8ml/min.

2) 除蛋白の検討

a) CA の至適過塩素酸濃度

HClO₄ の濃度変化による除蛋白効果を検討するため、血漿 1 ml に 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 N 4 種の濃度の HClO₄ 1 ml を加え除蛋白した。また血漿中 HClO₄ モル濃度は一定にし、すなわち血漿 1 ml に 0.5 N - 1 ml, 2.0 N - 0.25 ml 2 種の濃度の HClO₄ を加え除蛋白した。

b) 除蛋白による沈渣中の CA 濃度

除蛋白による沈渣を再度 HClO₄ に溶解させ、再除蛋白し、再除蛋白上清中の CA 定量を行ない CA 値の上昇を検討した。

3) CA alumina 吸着の検討

a) alumina 量と CA 吸着能力及び CA 値のバラツキ

alumina 量と CA 吸着能力及び CA 値のバラツキを検討すべく 5, 10, 50 mg の alumina に 0.5, 1, 5, 10 ng 4 種の基準液を加えた。

b) CA の至適 alumina 吸着 pH

CA はアルカリ性で不安定であり、なおかつ alumina に吸着される。0.5M tris buffer pH 8.0, pH 8.3, pH 8.5, pH 8.7, pH 9.0 に基準液 1 ng を加え、CA 至適 alumina 吸着 pH を検討した。

4) 電気化学検出器の電圧の検討

本装置は電圧を変えることにより検出される物質が異なるので、CA に最も適しなおかつ CA 代謝産物やその他の物質を抑え、CA のみに高いピークを得る電圧を検討した。

基準液 1 ng を HPLC に注入、電圧を 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1.0 V に変化させ、その際検出された NE, E, DHBA のピークの高さを測定した。

5)内部標準物質としての DHBA の検討

DHBA は CA と同様、同濃度に抽出され、電気化学検出器において CA と同様に定量可能であるか検討した。

Fig. 3. Effect of stabilizing reagents for the recovery of catecholamine.

Stabilizing reagents:

Na_2SO_3 5mg, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 5mg, EDTA-2Na 5mg

EDTA-2Na 5mg+ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 5mg.

Other conditions as in Fig. 2.

Table 1. Percent recovery of catecholamines as a function of various concentrations of EDTA-2Na, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ for stabilizing reagents.

concentrations, mg/10ml			recovery, %		
EDTA-2Na	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	ratio	NE	E	DHBA
10	100	1:10	33.33	26.53	33.79
10	75	1:7.5	40.12	36.73	44.82
10	50	1:5	47.69	41.22	58.27
50	10	5:1	38.35	46.42	43.26
75	10	7.5:1	45.28	40.31	45.15
100	10	10:1	57.01	41.53	58.12

Table 2. Percent recovery of catecholamines as a function of various concentrations of EDTA-2Na and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

concentrations, mg/10ml		recovery, %		
EDTA-2Na	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	NE	E	DHBA
10	10	55.94	48.37	54.99
50	50	48.20	42.85	50.00
150	150	37.02	39.09	39.04

結 果

1)安定剤の検討

a) 安定剤の選択 (Fig 3, Table 1, 2)

CA の安定剤として Na_2SO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, EDTA-2Na の単体及び EDTA-2Na と $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ の組み合わせを用いて検討すると、Fig. 3 に示すごとく、EDTA-2Na と $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ の組み合わせを用いる方法がもっとも良い回収率が得られた。この組み合わせによる NE, E 回収率を100%とすると、

EDTA-2Na を用いては80%， $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ， Na_2SO_3 を用いては60%であった。さらに，EDTA-2Na と $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ の組み合わせが最も回収率が良かったのでこの両者の比について検討すると，Table. 1 に示すごとく，EDTA-2Na： $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ =10：1 が最も回収率がよく約57%，EDTA-2Na： $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ =1：10 が最も回収率が悪く約33%であった。EDTA-2Na と $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ の濃度差による CA 回収率の相違は Table. 2 に示すごとく，EDTA-2Na と $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 各10 mg を用いた方法が最も回収率がよく NE で約56%であり，濃度が上がるごとに回収率は低下した。

EDTA-2Na： $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ =100 mg：10 mg（A）で得た回収率は NE 57.01%，E 41.53%，DHBA 58.12%であり，EDTA-2Na： $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ =10 mg：10mg（B）で得た回収率は NE 55.94%，E 48.37%，DHBA 54.79%であった。したがって NE，DHBA については（A）を安定剤として用いた方が高い回収率が得られ，NE，E，DHBA の回収率は約15%の差があった。E については（B）を用いた方が高い回収率が得られ，NE，E，DHBA の回収率は約7%の差があった。

CA の前処理操作中，pH 調整の際，EDTA-2Na を添加すると操作が容易であった。

Fig. 4. Difference of recovery of frozen-stored sample with and without stabilizing reagents.
Plasma: -20°C for 20 days
Other conditions as in Fig. 2.

b) 血漿保存に対する安定剤の役割（Fig. 4）

安定剤として EDTA-2Na と $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ を加えた場合及び加えない場合の検討では，各々に血漿 1 ml，基準液 5 ng を加え， -20°C で凍結したところ，Fig. 4 に示す通り両安定剤を加えると，CA は20日間安定であり，両安定剤を加えない検体は加えた検体の約 $\frac{1}{2}$ の回収率であった。

Fig. 5. Effect of protein precipitant for four different concentrations of 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0N perchloric acid. The conditions as in Fig. 2.

Table 3. Effect of making the protein precipitate again from the first protein precipitate for the recovery of catecholamines.

HClO ₄ normality	recovery, %		
	NE	E	DHBA
0.5	4.68	0.81	3.56
1.0	4.58	1.80	3.17
2.0	4.20	3.93	3.43

Percent recovery of first protein precipitate is 100 percent.

Table 4. Effect of protein precipitant for two different normalities of 0.5N-1.0ml perchloric acid/ml plasma and 2.0N-0.25ml perchloric acid/ml plasma.

HClO ₄ /ml plasma	recovery, %		
	NE	E	DHBA
0.5N - 1.0ml	54.67	51.81	56.26
2.0N - 0.25ml	55.10	52.10	56.48

2) 除蛋白の検討

a) CA の至適過塩素酸濃度 (Fig. 5, Table. 4)

血漿 1 ml に対し, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 N HClO₄ を除蛋白に用いた所, Fig. 5 に示す通り, 0.5, 1.0 N HClO₄ を用いると最も良い回収率が得られ, 次に 2.0 N HClO₄ そして 0.1 N HClO₄ であった。0.5 N を 100% とすると, 1.0 N では 99%, 2.0 N では 65%, 0.1 N では 30% であり, 0.5 N と 1.0 N とは差はなかったが, 試料の前処理中 pH 調整の際, 0.5 N HClO₄ を用いた方が 1.0 N HClO₄ を用いるより操作が容易であった。

血漿中 HClO_4 モル濃度は一定にし, すなわち血漿 1 ml に 0.5 N - 1 ml, 2 N - 0.25 ml, 2 種の濃度の HClO_4 を加え除蛋白した。その結果は Table 4 に示す通り, 両者の回収率の差は 5 % 以下であった。すなわち検体に対する HClO_4 濃度が一定であれば, 何規定の HClO_4 溶液を用いても CA の回収率には 5 % 以下の影響であった。したがって操作上, 適した規定度の HClO_4 を選択できた。

b) 除蛋白による沈渣中の CA 濃度 (Table. 3)

除蛋白による沈渣を再度 HClO_4 に溶解させ, 再除蛋白し, その上清中の CA を定量した結果は, Table. 3 に示す通りであった。再除蛋白せずに CA を定量した CA 値を 100 % とし, その沈渣を HClO_4 を用い再溶解, 再除蛋白して得られた CA は 5 % 以下であった。NE・DHBA は 0.5, 1.0, 2.0 N HClO_4 で, その差は 0.5 % 以下であった。E は 2.0 N HClO_4 が 0.5 N HClO_4 の約 5 倍であった。

3) CA の alumina 吸着の検討

a) alumina 量と CA 吸着能力及びバラツキ (Fig. 6)

alumina 10 mg と 50 mg の吸着能力の差は Fig. 6 に示す通り 5 % 以下であった。alumina 5 mg の基準液 0.5 ng の CA 回収率を 100 % とすると, 基準液 1 ng は 80 %, 5 ng は 70 %, 10 ng は 60 % であった。alumina 5, 10, 50 mg の CA 値のバラツキは 10 % 以下であった。alumina 5 mg では NE, E, DHBA 値間に 10 % 以上の差を生じることがあった。alumina 10 mg, 50 mg では各濃度を通じ NE, E, DHBA 値間のバラツキは 10 % 以下であった。

Fig. 6. Difference of adsorption between 5, 10 and 50mg at alumina.

b) CA の至適 alumina 吸着 pH (Table. 5)

0.5M tris buffer pH 8.0, pH 8.3, pH 8.5, pH 8.7, pH 9.0 に基準液を加え, 5 分後 alumina を加え CA を alumina に吸着させた。その結果は Table 5 に示す通りである。CA は pH 8.0 ~ pH 9.0 で alumina に吸着され, pH 8.5 で最大であった。pH 8.0 の CA 回収率は pH 9.0 の時より 5 ~ 10 % 高かった。tris buffer に alumina を加えた後, 基準液を加え, CA を alumina に吸着させた後, 直ちに pH を中性に戻し測定した pH 8.0 の回収率は pH 9.0 より 5 ~ 10 % 低かった。

Table 5. Percent recovery as a function of catecholamines adsorption on the alumina pH value.

pH	recovery, %		
	NE	E	DHBA
8.0	92.7	91.2	75.9
8.3	91.3	86.5	78.6
8.4	57.0	85.2	85.5
8.5	100.0	100.0	100.0
8.7	87.8	87.0	83.1
9.0	82.8	86.5	70.2

CA on pH8.5 = 100%

Fig. 7. Current-Potential curves for NE, DHBA and E.

4)電気化学検出器の電圧の検討

CAは0.6V付近を境として、電圧を下げるとピークの高さは急速に減少し、電圧を上げるとピークの高さはそのまま持続された。したがってCAのみ最も感度よく検出される最少の電圧は0.6 Vであった。

5)内部標準物質としてのDHBAの検討 (Fig. 8, 9, Table. 6)

DHBAが内部標準物質に成り得るかを検討した所、Fig. 8に示す通りDHBAのピークは他のピークと重ならず、また同濃度のCAと比較してピークの高さもFig. 9に示す通りEよりやや高かった。検量線は他のCAと同様、ピークの高さと濃度は直線関係にあり、さらに前処理についてもNE、Eと同様の動きをした。なおDHBAの回収率とNE及びEの回収率はTable 6に示す通り、その差は10%以下であった。

6)本測定法による測定値のバラツキの検討 (Table. 6)

同一5検体を同時に本法を用いて測定した所、Table. 6に示す通りNEは $54.11 \pm 1.66\%$ 、Eは $51.66 \pm 1.72\%$ 、DHBAは $55.38 \pm 2.30\%$ であり、その測定値のバラツキは2SD(2倍の標準偏差)で示すとNE 3.32, E 3.44, DHBA 4.6で、いずれも5%以下であり、充分な再現性を示した。

Fig. 8. Peaks of 100pg of NE, E, DHBA, dopa and DA on Chromatogram.

The conditions as in Fig. 2.

Fig. 9. Standard curve for DHBA, NE, E, assay.

Table 6. Percent recovery of NE, E and DHBA.

No.	recovery, %		
	NE	E	DHBA
1	53.64	50.81	55.26
2	55.16	54.16	57.48
3	52.14	51.30	52.10
4	53.30	49.63	54.44
5	56.38	52.44	57.64
average	54.11±1.66	51.66±1.72	55.38±2.30

Fig. 10. Correlation of high performance liquid chromatography with electrochemical detection method and double isotope method in plasma catecholamine.

考 察

生体試料に含まれる CA 濃度は pico 単位であり、高感度の分析法が要求される。

生物学的測定方法は化学的測定法に比し感度や特異性において優位となることもあるが、不安定で実験中に感度の変化することがあり、再現性に乏しく、研究用にはよいが化学的測定法のように一般的使用には耐えられない。

そこで化学的測定法の開発が進められた。その内、比色定量法は感度も悪く、特異性に乏しく、必ずしも一般的使用に適するものではないが、次の蛍光法への進歩のステップとして原理的には重要であった。

蛍光法は特異性に問題があるが高感度であることと、比較的安定した値を示すことから、精製法の進歩とあいまって広く用いられるようになった。しかし本法は薬剤投与時の体液中の妨害物質により、正確な値を得ることが難しい。DA は NE, E に比し蛍光強度が弱く、同一酸化条件で同時に測ることは困難である。

近年になり、Double Isotope (DI) 法、ガスクロマトグラフィー (GC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などが試みられるようになってきた。

DI法は現在までに報告されているCA測定法のうちで最も高感度な方法といえるが、放射性物質を扱う上に操作が煩雑であり、日本国内におけるルーチン分析には適していないようにみえる。

GCとHPLCを比較してみると、HPLCは親水性の化合物、溶媒抽出されにくい化合物、熱に不安定な化合物、不揮発性の化合物などを取扱う点では、遙かにGCにまさり、GCと同じく操作が簡単であり、GCの昇温操作に対応する勾配溶離法も可能だし、充填剤や溶離液の選択範囲も広い。

従来の液体クロマトグラフィーは分離時間が長く分離効率もよくなかった。最近このような点の改良がなされて、HPLCと呼ばれる技術が普及した。これはカラムとする充填剤が均一で微粒子化され、その単位重量当たりの分離表面積が大きく、高压に耐えるようになり、それに伴う発達として送液ポンプも高压一定流量で溶離液を流すことができるようになった。従来の分析では1日とか数時間を要したのが、HPLCは短時間で分離可能で、しかも分離効率は良くなっている。

さらに分離能のよいHPLCと選択的な検出法とを組み合わせると精度の良い測定ができる。すなわちこれは、蛍光分析法との組み合わせによるものと、電気化学検出器（ECD）との組み合わせによるものがある。両者を比較してみると蛍光法は先にも述べたように、DAの感度がNE、Eに比しおちるし、又ECDのようにCAの代謝産物を同時測定することは今の所困難である。そしてCAを一度蛍光物質に誘導しなければならぬので機械がそれだけ複雑である。生体試料中特に活性物質と呼ばれるものは、電極板上容易に酸化されて電流を生じやすい。故にECDを用いる場合、試料のclean-up操作が必要であり、その点蛍光法は前処理がECDより容易である。

今回我々はHPLCとECDの組み合わせにより血漿中CAを測定し、その内容を調べ、測定方法を考察し、我々の所で行っているDIの変法による測定法と比較検討した。本装置の精度については、既に報告⁵⁾¹⁰⁾したのでここでは割愛した。

CAの安定剤として、一般的にascorbic acid, Na_2SO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, EDTA-2Naなどが用いられている。CAの酸化に対するascorbic acidの影響はOesterling¹¹⁾によって詳しく研究された。彼女はascorbic acidの濃度が0.5 mMに達すると、酸性溶液中でCAに対し破壊作用を持つことを見出した。本測定にascorbic acidを用いた所、ascorbic acidはNEとEの間に感度 $\frac{1}{2}$, 10 pgでNEの200倍のピークを生じた。したがってascorbic acidは本測定に不向きであった。

CAの安定剤の作用について考察してみる。CAはカテコール-O-メチル転換酵素（COMT）及びモノアミン酸化酵素（MAO）により代謝されるが、これらの酵素は金属イオンにより基質と結びつき、EDTA-2Naなどのキレート剤はこれらの酵素が金属イオンと結びつくのを阻害し、自身が金属イオンと結合してキレートを作る。したがってCAの代謝は阻害される。またCAはMAOにより酸化されるが、これに対しascorbic acid, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ などの還元剤は還元的に働く。これらのことによりCAの安定剤として Na_2SO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, EDTA-2Naの単体及びEDTA-2Naと $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ の組み合わせの内では、EDTA-2Naと $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ の組み合わせが一番回収率が高かったのではないと思われる。

CAは保存状態の相違により、種々の値を生じる。Carruthers¹⁾らは氷冷した注射筒に血液を採取し、それを4℃に保ち速やかに遠心分離し、得られた血漿は-20℃にて保存し、これは1週間以内に測定すべきであるとした。またEDTA-2Naとascorbic acidを試料1 mlに対しそれぞれ10 μg および20 μg 加えて冷凍しておれば長期保存に耐えるという報告⁴⁾と分離した血漿に $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ を0.5 mg/ml加えておけば、血漿中のCAは室温で4時間、4℃で20~30時間、-20℃で2~3ヵ月は安定であるという報告¹⁵⁾がある。

そこで我々は試料 1 ml (血漿 1 ml, 基準液 5 ng, DHBA 5 ng) に安定剤として EDTA-2 Na と $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ をそれぞれ 10 mg 加えたものと加えないものを作り, 両者を 20 日後に測定した所, 前者は後者の約 2 倍のピークを得た。したがって採血後分離した血漿に安定剤を加える必要性が感じられる。NE, E, DHBA 三者の安定性をみると, DHBA は一番安定で, 次に NE そして E の順であり, NE は E よりかなり安定性があるという報告¹⁰⁾と一致した。

血漿には 60~80 mg/ml の高濃度の蛋白が含まれ, 血漿 CA 測定において除蛋白操作は不可欠である。CA は蛋白と結合する可能性があり, CA 標準液に蛋白を共存させた時と共存させなかった場合とを比較すると, その回収率は後者においておとる。が, 除蛋白操作自身回収率を下げることもある。我々は CA の回収率を上げるべく除蛋白による沈澱物の再溶解による CA 値の上昇を検討した所, 5%以下であった。しかし沈澱物の再溶解による CA 値の上昇が 5%以内では, 測定のバラツキにはいってしまう値であり, 手間をかけるほどの利点がないのでこの操作は省略した。

HClO_4 の濃度変化による除蛋白効果は 0.5, 1.0 N HClO_4 1 ml / 血漿 1 ml を用いた場合がもっとも CA のピークの高さが高かった。なお操作は 0.5 N HClO_4 を用いた方が, 1.0 N HClO_4 を用いるより容易であった。0.5 N HClO_4 1 ml を用いた場合と, 2.0 N HClO_4 0.25 ml を用いた場合の回収率の差は 5%以下であった。ということは血漿中モル濃度が一定である時, 規定度の相違による CA 回収率の相違は 5%以下であったということである。したがって検体量に応じ, HClO_4 の濃度を選べ (血漿中モル濃度一定), このことは, CA 抽出操作を円滑に運ぶ助けになった。

我々は CA の吸着に alumina を用いた。alumina は水酸化 aluminium より回収率も良いし, 除塩操作の煩雑およびそれによる CA の損失が防げるといわれる。そして alumina の性能については, 活性化操作の良し悪しに大きく依存する。我々が今回用いた alumina の活性化操作には, 測定に用いた alumina が微量であるため, 特に注意を払った。またその性能については, 製品の選択も極めて重要である。我々は以前 Merk 製の alumina を用いていたが, 今回は Woelm 製の alumina Woelm N, Akt 1 を使用した。その結果, 後者を用いた方が前者を用いるより約 10% 回収率の上昇が見られた。

CA の alumina 吸着において, pH 調整は重要点である。Goldenberg³⁾らによると, alumina 吸着された状態では CA は比較的安定化されているという。したがって試料液に alumina を加えてから pH を至適に移動して行くのが合理的である。しかし alumina を直接強酸性溶液に加えると alumina が部分的に溶解し CA の損失をきたすので, pH 5.5~pH 6.0 の間で試料に alumina を加えるとよい。あらかじめ試料溶液に EDTA-2 Na を加えておくことと緩徐に pH が変化し, pH 調整操作が容易であった。CA の至適 alumina 吸着 pH は, alumina が最も CA を吸着する pH であることと, CA の pH による分解とを考慮し, pH 8.5 に調整した。

CA の吸着法は精製法であると同時に優れた濃縮法である。溶出液量が一定の場合, alumina 量が減少すればするほど回収溶出液量が増加する。しかし alumina 量が微量のため CA 吸着力が不十分で, CA 値のバラツキが大きくなるようでは測定上問題である。我々が腫瘍組織中 CA を定量した際, 50 mg の alumina は 5829.44 ng の NE 及び 6357.33 ng の E を吸着した。これにより alumina は極微量でも高濃度の CA を吸着することがわかったが, alumina 5 mg では測定値のバラツキを生じる可能性が大きかった。

alumina 10 mg と 50 mg ではその吸着能力及びバラツキはほぼ同等であった。したがって検体に応じ alumina の量を 10~50 mg の範囲で選んだ。

本検出器の電圧を上げれば上げるほど、多くの物質が検出される。CA がもっとも感度よく検出される最少の電圧を求めることにより、clean up しきれずに注入液に混入してきた CA 不純物をある程度除去することが可能である。その電圧は本装置において0.6Vであった。

内部標準物質について、Moyer⁸⁾らは合成 CA である DHBA を内部標準物質として使用し、個々の検体の CA 値を正確に補正できると述べている。我々も DHBA が今回の測定法に使用できうるかを検討してみた。DHBA は CA のピークと重ならず、検量線は他の CA と同様、ピークの高さと濃度は直線関係にあり、さらに前処理についても NE、E と同様の動きをした。

DHBA の回収率が NE 及び E の回収率とどのような関係にあるかを調べることは、DHBA が CA の内部標準物質になり得るかの大切な点である。DHBA の回収率と NE 及び E の回収率との差は、10%以下であった。DHBA の回収率と NE 及び E の回収率の差を埋めるため、今まで考察してきた安定剤、除蛋白、alumina 量、電気化学検出器の電圧等のデーターを見直した所、次のことがわかった。安定剤として EDTA-2Na と $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ を血漿 1 ml に対しそれぞれ 1 mg ずつ用いるのが、回収率もよく、DHBA、NE、E 間のバラツキも少なかった。除蛋白は 0.5 N HClO_4 を用いても、1.0 N でも、その回収率にはほとんど差がなかった。しかし、0.5 N HClO_4 を用いるより、1.0 N HClO_4 を用いた方が、DHBA と NE、E 間のバラツキが少なかった。また、alumina 量が 10 mg 未満であると、DHBA と NE、E 間のバラツキが大きくなった。DHBA と NE、E 間のバラツキが 5 %未満のデーターもあり、今後の工夫で DHBA と NE、E 間のバラツキはさらに縮められると思われる。これらのことにより、DHBA は CA の内部標準物質に成り得るとみなした。これにより検体 1 本 1 本の回収率補正が可能である。

本法及び Double Isotope 法で正常血圧者 10 名と 5 ヲ所部位別採血した褐色細胞腫患者 1 名による計 15 検体を測定した。その結果は Fig. 10 に示す通りである。本法と Double Isotope 法は NE で $r = 0.9902$, $P < 0.05$, E で $r = 0.9973$, $P < 0.05$ で非常によい相関を示した。Double Isotope 法は isotope を使用し、操作が煩雑であるなどの問題点を持っているが、先にも述べた通り、現在までに報告されている CA 測定法のうちで最も高感度な方法といえる。動物血漿にしても、人血漿ならなおさらのこと、採血量を多くすることは難しい。したがって CA 測定における Double Isotope 法の意義は大きいと思われる。しかし Double Isotope 法に比べ本法は isotope を使用せず、安価であり、操作は遙かに容易である。本法は今後さらに検討が加えられ、CA 測定に大きな役割を果たすようになるのではないと思われる。

結 語

HPLC と ECD の組み合わせによる血漿 CA の測定における測定内容を検討してみた所、次に示す結果を得た。

- 1) 安定剤としては、血漿 1 ml に対し EDTA-2Na, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 各々 1 mg を加えたものが一番回収率が高く、これは 20 日の後に測定した所、加えないものの約 2 倍のピークを得た。
- 2) HClO_4 の濃度変化による除蛋白効果は、1 N HClO_4 1 ml / 血漿 1 ml を用いた場合が、最も CA のピークが高かった。
- 3) CA の吸着力は alumina 10 mg と 50 mg とでは、ほぼ同等であった。また CA の至適 alumina 吸着は pH 8.5 であった。

- 4)電気化学検出器の電圧は0.6Vが最もCA測定に適していた。
5)DHBAは内部標準物質として使用可能であった。
6)本法とDouble Isotope法は非常により相関関係を示した。

文 献

- 1) Carruthers, M., Taggart, P., Conway, N., Bates, D.: Validity of plasma-catecholamine estimations. *Lancet*, 2: 62-67, 1970. 2) Engelman, K., Portnoy, B., and Lovenberg, W.: A sensitive and specific double-isotope derivative method for the determination of catecholamines in biological specimens. *Amer. J. Med.* 255: 259-268, 1968.
3) Goldenberg, M., Serline, I., Edwards, T. and Rapport, M.M.: Chemical screening methods for the diagnosis of pheochromocytoma norepinephrine and epinephrine in human urine. *Amer. J. Med.*, 16: 310-327, 1954. 4) 今井一洋: カテコールアミン測定の現状, 救急医学, 2: 643-649, 1978. 5) 梶原長雄, 村上 彰, 橋田 潤, 小野雅史, 山村昭夫, 山本佳男, 国吉和重, 車谷 仁, 磯崎千恵子: 高速液体クロマトグラフィーと電気化学検出器の組み合わせによるカテコールアミンの測定について. *ホルモンと臨床*, 28: 1205-1210, 1980.
6) 河合 聡, 今井一洋: 生体試料の分析法, 代謝, 6: 915-923, 1969.
7) Kissinger, P.T., Refshauge, C., Dreiling, R. and Adama, R.N.: An electrochemical detector for liquid chromatography with picogram sensitivity. *Anal. Lett.*, 6(5): 465-477, 1973.
8) Moyer, T.P.: Optimized isocratic conditions for analyses of catecholamines by high-performance reversed-phase paired-ion chromatography with amperometric detection. *J. Chromatogr.*, 153: 365-372, 1978. 9) 村上 彰, 梶原長雄, 小林良子, 橋田 潤, 佐藤雅彦, 内山隆久, 北 隆, 小野雅史, 三上剛志, 井関康夫, 鄭 建雄, 寺島 紘, 三科信昭, 久代登志男, 波多野道信: Double-Isotope 法による catecholamine 測定の改良法の検討. *日内分泌*, 52: 524, 1976. 10) 村上 彰, 梶原長雄, 小林良子, 橋田 潤, 北 隆, 小野雅史, 鄭 建雄, 三科信昭, 藤林陽三, 長田次夫, 山本佳男, 国吉和重, 下田研二, 小林史幸, 車谷 仁, 大塚雄司, 磯崎千恵子: 高速液体クロマトグラフィーと電気化学検出器の組合せによるカテコールアミンの測定法の検討. *日内分泌*, 55: 575, 1979. 11) Oesterling, J.M.: The effect of ascorbic acid deficiency on the epinephrine content of the guinea pig adrenal. *Abstr. Comm. XIX Int. Physiol. Congress. Montreal*, 1953. 12) 小野雅史: 高血圧に関する研究—Double Isotope Derivative method による本態性高血圧症患者のカテコールアミンの再検討. *日大医誌*, 38: 23-33, 1979. 13) Shaw, F.H.: The estimation of adrenaline. *Biochem. J.* 32: 19-25, 1938. 14) Von Euler, U.S.: Noradrenaline, Charles C Thomas, Illinois, U.S.A., 1956, 8. 15) 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*, 12: 6, 1978. 特別掲載 (受付日: 56. 2. 24)