薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
100 (9) 925-932 (1980)

ダンシルヒドラジンを用いる生体試料中ケトステロイドのけい光高速液体
クロマトグラフィー：臨床分析への応用

河崎孝男, 前田昌子, 辻 章夫

昭和大学薬学部¹⁾

Fluorescence High-Performance Liquid Chromatography for Determination
of Ketosteroids in Biological Fluids Using Dansyl Hydrazine:
Application to Clinical Analysis

TAKAO KAWASAKI, MASAKO MAEDA, and AKIO TSUJI

School of Pharmaceutical Sciences, Showa University¹⁾

(Received April 11, 1980)

The determination of ketosteroids in biological fluids by a fluorescence high-performance liquid chromatographic procedure and the application of this method to clinical analysis of steroidal compounds in the human blood and urine are described. Corticoids are extracted with methylene chloride from 0.5 ml of plasma or 1 ml of urine, and 17-ketosteroids are extracted with methylene chloride after enzymatic hydrolysis or solvolysis (1 ml of urine or 0.1 ml of serum). Δ^4 -3-Ketosteroids and 17-ketosteroids are labelled with dansyl hydrazine in HCl-EtOH solution and in trichloroacetic acid-benzene solution, respectively, and chromatographed on a microparticulate silica gel column by use of CH_2Cl_2 -EtOH- H_2O mobile phase systems with a fluorophotometric detector at 350 nm (excitation) and 505 nm (emission). Comparisons with radioimmunoassay gave correlation coefficients of 0.978 ($n=36$) and 0.964 ($n=81$) for plasma cortisol and serum dehydroepiandrosterone sulfate, respectively. Metabolite of carbamazepine did not interfere with the analysis of urinary free cortisol. The serum concentrations of cortisol, 11-deoxycortisol and dehydroepiandrosterone sulfate after a single oral administration of 1.5 g metyrapone to human subjects were determined and the serum 11-deoxycortisol could be measured by this method as a rapid metyrapone test. The method is thus useful for the clinical analysis of ketosteroids in biological fluids.

Keywords—high-performance liquid chromatography; Δ^4 -3-ketosteroid; 17-ketosteroid; clinical analysis; plasma cortisol; serum 11-deoxycortisol; serum dehydroepiandrosterone sulfate; urinary free cortisol

緒 言

ステロイドホルモンは生体の微量活性物質として重要な働きをしており、その産生異常症として多種の疾患が知られている。血中や尿中ステロイドホルモンの日常分析法として Porter-Silber 反応や Zimmerman 反応による呈色反応を用い、17-hydroxycorticosteroids (17-OHCS), 17-ketogenicsteroids (17-KGS), 17-ketosteroids (17-KS) のように大別して分析する方法が行なわれている。しかし病型診断を正確に行なうためには、個々のステロイドを分離定量することが临床上重要である。従来ステロイドホルモンの分離定量法として沱紙-, 薄層-, カラム-, ガスクロマトグラフィーが用いられている²⁾が、日常の臨床分析にはほとんど応用されていない。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) も多成分の同時分析が可能であり、ステロイド分析への応用は Siggia ら³⁾

1) Location: 1-5-8, Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo, 142, Japan.

2) a) E. Heftman, "Chromatography," ed. by E. Heftman, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1975, pp. 610-636; b) E. Heftman, "Chromatography of Steroids, Journal of Chromatography Library," Vol. 8, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, New York, 1976.

3) S. Siggia, R.A. Dishman, *Anal. Chem.*, **42**, 1223 (1970).

によって始められ、血中および尿中コルチゾール,⁴⁾ 尿中エストロジエン⁵⁾ 等のステロイドホルモンの生体試料中の定量法も報告されている。しかしそれらは紫外領域の吸収帯を利用し、UV 検出法を行なっているため感度が少し悪く試料血清 1—2 ml を必要とする。高感度なけい光検出法をステロイドホルモンの分析に応用するために、著者らはカルボニル化合物に対するけい光試薬であるダンシルヒドラジン⁶⁾ をケトステロイドと反応させ、けい光検出器を接続した HPLC で分離定量する方法を検討し、血中および尿中コルチゾール,⁷⁾ 血中デヒドロエピアンドロステロンサルフェート⁸⁾ (DHEA-S) の定量法を確立した。今回はこのけい光-HPLC によるステロイドの定量法が、臨床分析に有用であることを確かめるために、下垂体機能検査であるメチラポン試験を健常者で行ない血中ステロイドの動態を測定した。また種々の患者試料について分析し、従来の測定方法との比較を行なった。

実験材料および方法

1. 実験対象 メチラポンおよびカルバマゼピンの投与は健常者で行なった。その他の血清および尿試料は昭和大学医学部付属病院中央検査室の検査材料より無作為に抽出して用いた。

メチラポン試験は、健常人 3 名にメチラポン 1.5 g を午前 10 時に 1 回内服させ、内服前および内服後 1 時間おきに 6 回採血し分析に供した。

カルバマゼピン 400 mg を午後 2 時に 1 回内服し、内服後 120 分の血清および 100 分と 190 分の尿を分析に供した。対照としてカルバマゼピン服用前の血清および尿を分析した。

2. 試薬 Δ^4 -3-Ketosteroid 類の標準物質として、progesterone, 17α -hydroxyprogesterone, 11-deoxycortisol, corticosterone, cortisone, cortisol の 6 種のステロイドを、また 17-ketosteroid 類の標準物質として、androsta-3,5-diene-17-one, androstandione, androstadienedione, Δ^4 -androstene-3,17-dione, androsterone, dehydroepiandrosterone, etiocholanolone, 11-ketoandrosterone, 11-ketoetiocholanolone の 9 種のステロイドを使用した。

ダンシルヒドラジン エタノール溶液：ダンシルヒドラジン (Sigma Chemical Co.) 2 mg をエタノールに溶かして 10 ml とする。

ダンシルヒドラジン ベンゼン溶液：ダンシルヒドラジン 20 mg をベンゼンに溶かして 10 ml とする

塩酸エタノール溶液：濃塩酸 0.9 ml をエタノール 500 ml に溶解する。

トリクロル酢酸 ベンゼン溶液：トリクロル酢酸 0.5 g をベンゼンに溶かして 100 ml とする。

ピルビン酸 ベンゼン懸濁液：ピルビン酸ナトリウム 50 mg をベンゼン 10 ml に懸濁する。

3. HPLC の装置および至適分離条件 装置は日立 634 A 型高速液体クロマトグラフ、カラムは日立ゲル 3042 (250×4 mm I.D.)、カラム温度は 35°, 検出器は日立けい光分光光度計 204 型(光源：キセノンランプ)を用い励起波長 350 nm, けい光波長 505 nm でのけい光強度を示すピーク高で定量した。溶離液にはジクロルメタン-エタノール-水の 3 成分系を用いた。溶離液 1：ジクロルメタン 980 ml, エタノール 15 ml および水 5 ml を分液ロートにいれ、室温で 60 分間振とうした後分離する有機溶媒層。溶離液 2：ジクロルメタン 948 ml, エタノール 35 ml および水 17 ml を分液ロートにいれ、室温で 60 分間振とうした後分離する有機溶媒層。溶離液 3：ジクロルメタン 400 ml, エタノール 1 ml および水 2 ml を分液ロートにいれ、室温で 30 分振とうした後

4) a) F.K. Trefz, D.J. Byrd, W. Kochen, *J. Chromatogr.*, **107**, 181 (1975); b) J.H.M. van den Berg, Ch.R. Mol, R.S. Deelder, J.H.H. Thijssen, *Clin. Chim. Acta*, **78**, 165 (1977); c) G. Schwedt, H.H. Bussemas, Ch. Lippman, *J. Chromatogr.*, **143**, 259 (1977); d) P.M. Kabra, L. Tsai, L.J. Martone, *Clin. Chem.*, **25**, 1293 (1979); e) J.Q. Rose, W.J. Jusko, *J. Chromatogr.*, **162**, 273 (1979); f) G. Cavina, G. Moretti, R. Alimenti, B. Gallinella, *J. Chromatogr.*, **175**, 125 (1979).

5) a) R.J. Dolphin, *J. Chromatogr.*, **83**, 421 (1973); b) R.J. Dolphin, P.J. Pergande, *J. Chromatogr.*, **143**, 267 (1977).

6) R.W. Frei, J.F. Lawrence, *J. Chromatogr.*, **83**, 321 (1973).

7) T. Kawasaki, M. Maeda, A. Tsuji, *J. Chromatogr.*, **163**, 143 (1979).

8) T. Kawasaki, M. Maeda, A. Tsuji, in preparation,

Fig. 1. Separation of Fluorescent Derivatives of 4-3-Ketosteroid Standard Mixture

Peaks; 1=progesterone, 2=17 α -OH-progesterone, 3=DNS-reagent, 4,4'=11-deoxycortisol 5=corticosterone, 6=cortisone, 7=cortisol. Column; Hitachi gel 3042 (250 $\times$ 4 mm I.D.). Mobile phase and flow rate; (A) dichloromethane-ethanol-water (980: 15: 5), i=0.56 ml/min ii=1.36 ml/min., (B) dichloromethane-ethanol-water (948: 35: 17), 1.0 ml/min.

Fig. 2. Separation of Fluorescent Derivatives of 17-Ketosteroid Standard Mixture

Peaks; 1=androst-3,5-diene-17-one, 2=androstandione, 3=androstadienedione, 4=4'-androst-3,17-dione, 5=androsterone, 6=dehydroepiandrosterone, 7=etiocholanolone, 8=11-ketoandrosterone, 9=11-ketoetiocholanolone. Column; Hitachi gel 3042 (250 $\times$ 4 mm I.D.). Mobile phase and flow rate; dichloromethane-ethanol-water (400: 1: 2), 1 ml/min.

分離する有機溶媒層. 11-デオキシコルチゾール, コルチコステロン, コルチゾン等の分析には, 溶離液 1 を 0.56 ml/min の流速で用いると Fig. 1-A に示すようによく分離して検出される. しかしこの条件ではコルチゾールの保持時間が長いので, コルチコステロンが溶出した後流速を 1.36 ml/min とした. コルチゾールのみを分析する場合は, 溶離液 2 を 1.0 ml/min の流速で用いると Fig. 1-B に示すように約 10 分でコルチゾールの測定が行なえる.⁷⁾

17-ケトステロイド類の分析には, 溶離液 3 を 1.0 ml/min の流速で用いると Fig. 2 に示すような標準物質のクロマトグラムが得られた. この条件で 17-ケトステロイド類として主要なアンドロステロン, デヒドロエピアンドロステロン, エチオコラノロンが充分に分離して検出される.⁸⁾

4. 生体試料の分析 1) 血液および尿中コルチコステロイド類の分析——試料として, 血漿または血清では 0.5 ml を, 尿では 1.0 ml を用い, それぞれにジクロルメタン 10 ml および 1 N 水酸化ナトリウム 0.1 ml を加え, 1 分間攪拌してステロイドを抽出し, ジクロルメタン層を 0.01 N 硫酸 1 ml で洗浄後 7 ml を窒素ガス気流下濃縮する. 残渣に塩酸エタノール溶液 0.1 ml を加えて溶解し, ダンシルヒドラジン-エタノール溶液 10 μ l を加え, 室温で 30 分反応させる. 反応液を窒素ガス気流下濃縮乾固し, 残渣をクロロホルム 100 μ l に溶解しその一定量を HPLC に注入する.

2) 尿中 17-ケトステロイド類の分析——加水分解は Curtius⁹⁾ らの方法にしたがって行なった. すなわち試料尿 1 ml に 2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.2) と Helicase (Boehringer Mannheim) を加えて酵素水解した. ステロイドの抽出はジクロルメタン 6 ml を加えて行ない, その 4 ml を窒素ガス気流下濃縮乾固する. 残渣にトリクロル酢酸ベンゼン溶液 0.2 ml を加えて溶解し, ダンシルヒドラジン-ベンゼン溶液 0.1 ml を加え 60° で 20 分反

9) H.Ch. Curtis, "Clinical Biochemistry. Principles and Methods," Vol. I. ed. by H.Ch. Curtis and M. Roth, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1978, pp. 700—753.

応させる。これにピルビン酸ベンゼン懸濁液 0.1 ml を加え、さらに 60° で 10 分反応させる。反応液を窒素ガス気流下除去し、残渣にジクロルメタン 3 ml と 0.25 N 水酸化ナトリウム 1 ml を加え攪拌することにより、ステロイドのダンシルヒドラゾン化物をジクロルメタン層に抽出し、その一定量を HPLC に注入する。

3) 血清中 DHEA-S の分析——試料血清 50—100 μ l を水で希釈して 1.5 ml とし、ジクロルメタン 5 ml で遊離のステロイドを抽出除去する。水層 1 ml に酢酸エチル 10 ml と濃硫酸 0.1 ml を加え 1 分間攪拌し、酢酸エチル層を 40° で 3 時間インキュベートしてソルボリシスした。反応後酢酸エチル 7 ml を窒素ガス下濃縮し、これを上記 2 の方法でダンシル化した後ジクロルメタン抽出液を濃縮し、クロロホルム 100 μ l に溶解しその一定量を HPLC に注入する。

結 果

1. 血液および尿試料についての分離パターン

血液および尿試料を前述の方法により分析した例を Fig. 3 に示した。HPLC の測定条件は、I, II, III につい

Fig. 3. Typical Chromatograms of Human Plasma, Serum and Urine Samples

(I) normal human plasma (injected volume of the final solution; 40 μ l), (II) chushing syndrom patient's plasma (30 μ l), (III) urine taken 190 min after a single oral dose of 400 mg carbamazepine (40 μ l), (IV) serum taken 4 hr after a single oral dose of 1.5 g metyrapone (25 μ l), (V) normal human serum (20 μ l), (VI) chushing syndrom patient's urine (12 μ l).

ては Fig. 1-B と、IV については Fig. 1-A と、また V, VI については Fig. 2 と同じである。血中および尿中コルチゾール (F)、血清中 11-デオキシコルチゾール (S)、血清中 DHEA-S、尿中アンドロステロン (AN)、DHEA、エチオコラロン (ETIO) が、それぞれ他の生体成分から分離して検出された。

2. メチラポン服用時の血中ステロイド濃度の動態について

メチラポン内服時の血中ステロイド量の動態を検討する目的で、実験の部に述べたスケジュールで検体を採取し分析した。Fig. 4 にその結果を示した。血清コルチゾール濃度はメチラポン内服後直ちに減少し始め、3 時間後に最低値を示した。また血清中の S 濃度はメチラポン内服後直ちに上昇し始め、4—6 時間後に最高値 (19.1 ± 1.1 μ g/dl) を示し、服用前のレベル (1.4 ± 0.2 μ g/dl)

Fig. 4. Time Courses of Serum Steroid Hormone Levels after a Single Oral Administration of 1.5 g Metyrapone

○: A.T. (Age, 50; Sex, M). ●: M.M. (39; F). △: T.K. (30; M).

Fig. 5. Correlations between Fluorescence HPLC and RIA Values of Plasma Cortisol and Serum Dehydroepiandrosterone Sulfate

Fig. 6. Comparisons of the Results obtained with the Fluorescence HPLC Method and Zimmerman Method for the Determination of 17-Ketosteroids

●: male, ×: female, —: normal value of male, ----: normal value of female.

の約 13.5 倍の上昇を示した。また血清中 DHEA-S 濃度は血清 S と同様の動態を示し、服用前に比べて 2—2.5 倍の上昇を認めた。

3. カルバマゼピン服用時のコルチゾールの測定

カルバマゼピンは Porter-Silber 反応による 17-OHCS 測定を妨害する薬物であるが、本法では妨害を受けな

Fig. 7. Comparison of 17-OHCS Values and Free Cortisol Values in Urine

○: acute myocardial infarction patient.

なった.¹¹⁾ これは 17-KS を Zimmerman 反応により発色させ、その吸光度を測定する方法である。この方法による 17-KS 測定値を横軸に、本法により得られた AN, DHEA, ETIO の各測定値を縦軸にとりその関係を比較したところ、Fig. 6 に示す分布を得た。Zimmerman 反応による 17-KS 測定値と本法による AN, DHEA, ETIO 測定値の総計値はある程度の相関 ($r=0.86$) を示したが、DHEA では $r=0.52$ と直線相関が得られず、また個々の検体に含まれる 3 種のステロイドの比率は一定でなかった。

6. 日常分析法による尿中 17-OHCS 測定値と本法による尿中遊離 F 測定値の関係

17-OHCS の測定は、尿を β -glucuronidase で酵素加水分解後ジクロルメタンでステロイドを抽出し、Porter-Silber 反応により発色させて行なった。17-OHCS 値を縦軸に、本法による F 測定値を横軸にとりその関係を比較したところ、Fig. 7 に示す分布を得た。17-OHCS 値が正常域 (2.3—11.2 mg/day) にあるものでも遊離 F 値は広範囲な測定値 (0.002—0.21 mg/day) を示した。

考 察

ダンシルヒドラジンとの反応条件や溶離液の極性を変化させることにより、 Δ^4 -3-ketosteroid 類 6 種、17-ketosteroid 類 9 種を十分に分離して検出することができた。溶出時間や分離に対するダンシル基の影響について、 Δ^4 -3-ketosteroid 類を用いて検討した。溶離液 1 を用い、0.96 ml/min の流速で Δ^4 -3-ketosteroid 類を溶出し、UV (254 nm) 検出した溶出時間を横軸に、ダンシル化した Δ^4 -3-ketosteroid 類を同じ条件で溶出し、けい光検出した溶出時間を縦軸にとると、Fig. 8 に示すように両者の間により相関性 ($r=0.99$) が示された。このことはダンシル化されたステロイドにおいても分離に及ぼす要因はステロイド自身の構造に由来しており、ダンシル基は溶出時間を早める要因となることを示している。本法を他のステロイドの測定に応用する場合、そのステロイドの分離条件の推定に利用することが可能であると思われる。

メチラポンは副腎皮質ステロイドホルモンの生合成過程において 11β 水酸化を特異的に阻害し、ステロイドの生合成は 11-デオキシコルチゾール、11-デオキシコルチコステロンの段階で止まる。下垂体前葉からの ACTH 分泌はコルチゾール濃度の減少により増加し、その結果副腎皮質ホルモンの生合成が刺激され、11-デオキシコルチゾール、11-デオキシコルチコステロンの濃度が増加する。そこでこのステロイドを測定することで下垂体の ACTH 分泌能を検査するのがメチラポン試験である。¹²⁾ 従来の方法はメチラポン 500—750 mg を 4 時間ごと 1 日 6 回経口投与した後の 24 時間尿のステロイドを、17-OHCS または 17-KGS として測定している。

10) a) T. Nishina, A. Tsuji, D.K. Fukushima, *Steroids*, 24, 861 (1974); b) 国分知子, 久富優子, 大内力男, 森 弘, 神戸川明, 古屋清英, 田 根培, 吉田孝雄, 高木繁夫, 日内分泌誌, 54, 117 (1978).

11) 志田圭三, 伊藤善一, “臨床検査技術全書第 6 巻, 臨床化学検査 II,” 石井 暢編, 医学書院, 東京, 1975, pp. 558—565.

12) E.M. Gold, J.R. Kent, P.H. Forshman, *Ann. Intern. Med.*, 54, 175 (1961).

いことを確かめるために検討した。結果はカルバマゼピン内服後のコルチゾール濃度は血清中では 36.4 ng/ml, 尿中では 29.9 および 27.3 ng/ml であり、対照時の濃度 (血清中 54.6 ng/ml, 尿中 28.6 ng/ml) と有意の差を認めなかった。

4. ラジオイムノアッセイ (RIA) との相関

血漿 F および血清 DHEA-S について、本法と RIA 法¹⁰⁾ との相関性を検討したところ Fig. 5 に示す分布を得た。血漿 F は 36 検体で相関係数 $r=0.978$, 血清 DHEA-S は 81 検体で相関係数 $r=0.964$ と共によい直線相関を示した。

5. 日常分析法による尿中 17-KS 測定値と本法による 17-ケトステロイド類測定値の関係

17-KS 測定は関東化学社製のオスキット®を用いて行

この方法では検査結果を得るのに3日を要する。最近メチラポン1回経口投与後の血中SをRIA法で測定する簡単で直接的な方法が報告されている。¹³⁾これを本法に応用したが、血清S濃度はメチラポン服用後4—6時間で最高値に達し、本法を用いればその日の内に検査結果が得られる。また従来の方法では17-OHCS排泄が2—4倍、17-KGS排泄が2倍に増加するのを指標としていたが、血清Sは約13.5倍の増加がみられ、より確実に検査結果が判明できると思われる。血清DHEA-Sも2—2.5倍の増加がみられ、この試験に利用できると思われるが、血清Sを測定した方がより直接的である。

日常分析に用いられている17-OHCS測定は、投与された薬剤またはその代謝物の干渉作用により妨害される

ことがある。¹⁴⁾カルバマゼピンもその一つで、その代謝物がPorter-Silber反応の反応条件でPorter-Silber反応により呈色する物質に変換して測定を妨害する。¹⁵⁾本法はより緩和な反応条件(室温, 30分)であり、さらにHPLCを用いた分離分析法であることより、カルバマゼピン服用時でも血漿および尿中Fが妨害を受けることなく測定が可能である。

近年RIAの発展により血中および尿中ステロイドホルモンの大部分が高感度に分析されている。¹⁶⁾本法を用いた血中FおよびDHEA-S測定値はRIA法による測定値との間に良好な相関を得た。本法による各ステロイドの最少検出量は200 pgであり、RIA法に比べ感度はやや低いが、検出器に日本分光製FP-110を用いると約4倍、日立製650-10 LCを用いると約15倍の感度の上昇が得られた。HPLCを用いた分離分析法は、一度の測定で多成分の分析が可能であり臨床分析上重要な手法である。

17-Ketosteroid類は副腎皮質と性腺から分泌されるアンドロジェンに由来しており、その測定は副腎と性腺の疾患の鑑別診断に重要である。従来は17-KSとして測定する方法が主として用いられている。本法によるAN, DHEA, ETIO測定の結果、3種の総計値が17-KS値とある程度の相関($r=0.86$)を示すにもかかわらず、個々のステロイド値は多様のパターンを示し、特にDHEAの相関性($r=0.52$)が劣っていた。このことは疾患を正確に診断するためには、分離分析法を用いて多種のステロイドを同時に測定し、その動態を調べることが重要であることを示している。現在17-KS類の分離分析法としてGCが用いられており、加水分解後の尿抽出物をアルミナカラムで前処理したのち測定しているが、⁹⁾本法ではこのような操作が不要であった。

尿中遊離Fは血中で蛋白結合していないF濃度を反映するといわれ、最近尿中遊離Fの測定が重要視され、各種の疾患で測定が始められている。¹⁷⁾本法による遊離F測定値と17-OHCS測定値を比較したところ、17-OHCS値が正常域にあるものでも遊離FはRuderら¹⁸⁾による正常域(0.028—0.078 mg/day)からはずれるものが多数みられた。遊離Fが高値に測定されるものに心筋梗塞患者の尿でみられ、これはWiener¹⁹⁾が心筋梗塞患者の血清Fが正常人の約3倍の高値を示すと報告していることと併わせて考えると興味ある結果である。

Fig. 8. Relationship of Retention Time between Free Steroids and DNS-steroids

○: progesterone, ●: 17 α -OH-progesterone,
□: 11-deoxycortisol, ■: corticosterone,
△: cortisone, ▲: cortisol.

- 13) a) C.A. Strott, C.D. West, K. Nakagawa, T. Kondo, F.H. Tyler, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **29**, 6 (1969); b) W. Jubiz, A. W. Meikle, C.D. West, F.H. Tyler, *Arch. Intern. Med.*, **125**, 472 (1970).
- 14) 工藤良子, 外山美千代, 寺山百合子, 佐藤 誠, ホルモンと臨床, **25**, 1951 (1977).
- 15) K. Arase, Y. Katayama, Z. Ogawa, C. Hayashi, M. Miyata, K. Shimada, T. Nambara, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 3093 (1976).
- 16) 出村 博“続ラジオイムノアッセイ,” 入江 実編, 講談社サイエンティフィク, 東京, 1979, pp.56—76.
- 17) 出村 博, 古関千寿子, 小田桐恵美, 地曳和子, 前田忠雄, 出村黎子, 鎮目和夫, 総合臨床, **27**, 2351 (1978).
- 18) H. Ruder, R.L. Guy, M.B. Lipsett, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **35**, 219 (1972).
- 19) K. Wiener, *Clin. Chim. Acta*, **76**, 243 (1977).

結 語

ダンシルヒドラジンをけい光ラベル化剤に用いるけい光-HPLC 法を、血中および尿中ケトステロイドホルモンの分析に応用した。下垂体機能検査であるメチラボン試験が本法により、血清 S を測定することで迅速に行なえる。尿中遊離 F も薬剤の妨害がなく測定できた。血清 F および DHEA-S は RIA 法と良好な相関を示した。尿中 17-KS 類の同時分離分析が可能である。以上の結果より、本法が臨床分析でのケトステロイド類の測定に十分適用できると思われる。