ヒト尿中 3-Methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol (MHPG) の 新しい固相抽出法

平田紀美子,* 稲垣弘文, 南 正康
日本医科大学衛生学公衆衛生学教室

A New Solid-phase Extraction Method for Human Urinary 3-Methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol

Kimiko HIRATA,* Hirofumi INAGAKI, and Masayasu MINAMI
*Department of Hygiene and Public Health, Nippon Medical School,
1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan*

(Received June 27, 1996)

A new solid-phase extraction procedure for urinary 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol (MHPG) was established. Sep-Pak Diol cartridge was used, because MHPG is a neutral and alcoholic compound. Aqueous samples were adsorbed to the cartridge, then MHPG was eluted by the addition of ethyl acetate. After the eluate was evaporated, the residuum was dissolved with HPLC mobile phase and injected into HPLC. The extraction procedure was highly specific to MHPG, and none of other acidic catecholamine metabolites, such as vanillylmandelic acid (VMA), homovanillic acid (HVA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), was extracted. The recovery of MHPG using this method was over 90% and higher than those using previously described methods such as liquid-liquid extraction with ethyl acetate. Of the three vanillyl alcohol isomers, isovanillyl alcohol was the most suitable as an internal standard for the correction of column-to-column variation of the recovery. Human urinary unconjugated MHPG extracted by the new procedure could be measured by HPLC with a fluorescence detection. Further complicated derivatization and more sensitive detection systems, such as GC-MS and HPLC-electrochemical detector (ECD), were not needed due to high selectivity and high recovery of the extraction procedure. In addition, the urinary total (conjugated plus unconjugated) MHPG content could also be determined by the same procedure after an enzymatic hydrolysis of conjugated MHPG. The newly developed extraction procedure was simple, rapid and highly specific, and might be applicable to the analysis of MHPG in various body fluids.

Key words—MHPG; solid phase extraction; urine; HPLC; noradrenaline

緒

言

尿中カテコールアミン類 (CAs) 代謝物は、中枢、末梢神経系等におけるカテコールアミン代謝の異常を推定する指標として臨床生化学検査で測定されている。¹⁾ 特に noradrenaline (NA) 及び adrenaline (A) の主要代謝物である vanillylmandelic acid (VMA) や、dopamine (DA) 代謝物である homovanillic acid (HVA) の尿検体での検出は、neuroblastoma (NB) や pheochromocytoma などの新生児先天性代謝異常のスクリーニングとして汎用されている。²⁾ しかし、NB

や pheochromocytoma 患者の尿中あるいは血中 VMA, HVA が必ずしも高値を示すとは限らず、他の CAs 代謝物の測定も必要であると言われている。³⁾

尿中の 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol (MHPG) は、中枢神経系の NA 代謝物の 1 つとして古くから測定が試みられてきた。⁴⁾ うつ病患者の尿中 MHPG 排泄量は、特に双極型うつ病で低下し、躁状態あるいはうつ状態から躁状態への移行に伴い上昇するという報告が多い。変化がみられなかったという例もあるが、尿中の MHPG はある程度躁うつ病の病態を反映している可能性がある。

近年、MHPG は末梢の交感神経系由来の可能性も示唆され、MHPG 硫酸抱合体 (MHPG-SO₄) が中枢由来、グルクロン酸抱合体 (MHPG-G) が末梢由来であると報告されているが、未だ不明の部分が多い。⁵⁾

CAs 代謝物の測定は、これまで高速液体クロマトグラフィー-電気化学検出 (HPLC-ECD) 法⁶⁾ や蛍光検出 (HPLC-FD) 法,⁷⁾ あるいはガスクロマトグラフィー (GC 法),⁸⁾ ガスクロマトグラフィー-質量分析 (GC-MS 法)⁹⁾ によって行われてきた。HPLC-ECD 法や GC 法, GC-MS 法などの検出法は高感度ではあるが、検体の前処理が煩雑であった。また、蛍光検出法でもエチレンジアミン (EDA) 法,¹⁰⁾ トリヒドロキシインドール (THI) 法¹¹⁾ 等では蛍光体への誘導が必要であった。

一方、CAs が自然蛍光を発することは Duggan らによって報告されており、¹²⁾ 代謝物についても自然蛍光を用いて測定することが可能であると報告されている。⁷⁾ しかし、体液中には蛍光を発する物質が多数存在し、測定の妨害となるので、自然蛍光を用いて HPLC-FD で分析する際には、やはり煩雑な検体の前処理が必要であった。

これまで、MHPG の抽出には主に酢酸エチルによる液/液抽出が用いられてきたが、回収率や特異性が低かった。⁶⁾ 近年、HPLC に注入する前に固相抽出による MHPG の精製・分離法が報告され有用性が示唆されているが、これらの方法は、C18¹³⁾ や Phenyl^{14,15)} などの無極性相を固相として用いており、カラムから溶出した後、再度酢酸エチルによる抽出操作を必要としている。本研究では MHPG が VMA や HVA 等の酸性代謝物と異なり、中性分子であることが既存の方法による分離定量を困難にしていると考え、自然蛍光を用いた測定を可能にする、簡便でかつ MHPG 特異的な抽出法を開発することを試みた。

実 験 の 部

1. 試薬 以下の試薬を用いた。

MHPG, HVA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid (VA), Sulfatase (E.C.3.1.6.1 Type H-2) (以上, Sigma)。

4-Methoxy-3-hydroxybenzyl alcohol (iso-VAI; Internal Standard (IS)), 3-methoxy-4-hydroxybenzyl alcohol (VAI), 2-methoxy-4-hydroxybenzyl alcohol (o-VAI) (以上, Aldrich), VMA (和光純薬)。

n-Hexane-300 (残留農薬測定用)

以下の 3 種類の有機溶媒は高速液体クロマトグラフ用として市販されているものを使用した。

酢酸エチル, アセトニトリル, メタノール (和光純薬)。

なお、希釈等に用いた H₂O は蒸留水を脱気して使用した。

2. 標準溶液 (STD) の調製及び尿サンプルの保存 0.1 N HCl に溶解した各標準物質 (6

mM) を以下のように H₂O で希釈した. MHPG, DOPAC, VA, HVA は 4 nmol/ml を, VMA は 2 nmol/ml を混合し調製した.

採取した尿サンプルは濃塩酸を加えて (尿 10 ml に対し conc. HCl 10 μ l) 塩酸酸性とし, 測定するまで -20°C で保存した.

3. 抽出 (1) 液/液抽出——尿又は STD 溶液 (0.4 nmol/ml) 0.5 ml にイオン強度を上げ, 抽出効率を上げる目的で NaCl 0.3 g を加えて十分に混合した. これに各々の pH の緩衝液 (pH 1=1 M HCl-KCl, pH 2 及び 3=1 M NaPi, pH 4 及び 5=1 M citrate buffer, pH 6 及び 7=1 M NaPi) を 1 ml 加えた. ここへさらに酢酸エチル 2 ml を加えて 5 分間振盪し抽出した. 3000 $\times g$ で遠心した後, 酢酸エチル層を集めた. 新たに酢酸エチル 2 ml を水層に加え, 再度同様に抽出し, 先に集めた抽出液と合わせた. 酢酸エチルを減圧乾固し, 残渣を HPLC 用移動相 A 液に溶解して HPLC に注入した.

(2) 固相抽出 (順相) ——1) Sep-Pak カートリッジのコンディショニング: Sep-Pak Silica, Diol, CN の各カートリッジ (3 ml の Sep-Pak Vac (充填剤 500 mg, Waters)) は, メタノール, 酢酸エチル, *n*-ヘキサンをそれぞれ 3 ml ずつ順次流して洗浄後使用した.

2) 遊離 MHPG: コンディショニングした各カートリッジに, 尿+IS 溶液 (1 nmol/ml) 又は STD 溶液 (2 nmol/ml)+IS (1 nmol/ml) 溶液を 0.2 ml アプライし, SPE Manifold (J&W scientific) で吸引した. サンプルが十分カラムに浸透した後, *n*-ヘキサン 1 ml でカートリッジを洗浄し夾雑物を除去した. 保持された MHPG 及び IS を酢酸エチル 2 ml で溶出した. 酢酸エチルの分画 2 ml を Speed Vac Concentrator (Savant) で減圧乾固し, 残渣を HPLC 移動相 A 液 1 ml に

Fig. 1. Schematic Representation of the Extraction Procedure for Urinary Unconjugated and Total (Unconjugated Plus Conjugated) MHPG

溶解して 100 μ l HPLC に注入した (Fig. 1).

3) 総 MHPG: 蒸留水で 5 倍に希釈した尿 0.5 ml に IS 溶液 (1 nmol/ml) 0.5 ml と Arylsulfatase/ β -Glucuronidase (Type H-2) 0.2 ml を加えて混和した後, 37°C の水浴中で 2 時間加水分解した. インキュベート後, 遊離型と同様に MHPG と IS を抽出し, HPLC で分析した (Fig. 1).

4. HPLC 条件 以下の条件で分析を行った. IS 候補群を早く溶出させるため, グラジエント溶出を行った. HPLC 装置は, ポンプ (Gilson Model 305 及び 302), デガッサー (JASCO DG-980-50), カラムオーブン (Shimadzu CTO-6A), 蛍光検出器 (Shimadzu RF-535), オートサンプラー (Gilson Model 231) を接続したものをを用いた.

カラム: Wakosil-II 5C18-HG (250 mm $\times$ 4.6 mm 内径) + 同プレカラム (30 mm $\times$ 4.6 mm 内径). 移動相: A 液-50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0). B 液-アセトニトリル: 水 (1:1 v/v). グラジエント: 0% B 液から 20% B 液への 30 分間直線グラジエント. 流速: 1.0 ml/min. カラム温度: 45°C. 蛍光検出条件: 蛍光波長 (Em)/励起波長 (Ex)=320/280 (nm).

結 果

1. 液/液抽出法による回収率

CAs 代謝物の単離には, これまで主として酢酸エチル抽出法が用いられてきた. そこで, 抽出時の pH を 1—7 に調節し, 0.4 nmol/ml の STD 溶液を用いて各 pH における MHPG の回収率を比較した. その結果, MHPG の回収率は pH 1—3 の酸性時には 6% 以下で pH 7 でも 30% 足らずであった (Table 1).

2. 順相固相を用いた抽出による分離とその回収率

MHPG は逆相固定相への吸着が弱く, また, 酸性代謝物とは異なり, pH を下げることで逆相への吸着量を増加させることもできないので, 順相系の固相を選んだ. また, MHPG 類似のアルコール性化合物である VAl, iso-VAl, o-VAl の 3 種類を IS の候補として用いた.

Fig. 2 に STD 溶液を用いて pH 7.0 の条件で固相抽出を行った後の HPLC 分離パターンを示した. 固相には, Diol, Silica, CN の 3 種類を

Table 1. Effect of pH on the Recovery of MHPG by Liquid-Liquid Extraction with Ethyl Acetate

pH	Recovery (%)			
	VMA	DOPAC	MHPG	VA
1	15.06	— ^{a)}	5.15	38.36
2	1.67	31.93	1.25	22.46
3	4.76	17.67	0.67	31.19
4	25.28	54.33	— ^{a)}	43.44
5	10.08	51.17	26.90	23.19
6	5.02	9.08	26.64	29.56
7	3.30	8.8	30.72	27.69

^{a)} not detected.

Fig. 2. HPLC Chromatograms of a Mixture of Authentic Standards before (None) and after Extraction with Sep-Pak CN, Silica or Diol

Table 2. Recoveries of Catecholamine Metabolites and Vanillyl Alcohol Isomers by Solid-Phase Extraction with Sep-Pak Diol, Silica and CN

Sep-Pak	Recovery (%)							
	VMA	DOPAC	VA	HVA	MHPG	VAI	iso-VAI	o-VAI
Diol	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	92.2	96.6	93.2	90.0
Silica	— ^{a)}	— ^{a)}	30.9	— ^{a)}	91.1	110.5	103.0	94.8
CN	— ^{a)}	— ^{a)}	41.2	30.9	93.7	94.7	89.7	68.1

a) not detected.

Fig. 3. HPLC Chromatograms of a Urine Sample before (None) and after Extraction with Sep-Pak CN, Silica or Diol

Fig. 4. HPLC Chromatograms of an Arylsulfatase/β-glucuronidase-hydrolyzed Urine before (None) and after Extraction with Sep-Pak CN, Silica or Diol

用いた。この3種類の固相はいずれも MHPG, VAI, iso-VAI, o-VAI と同程度の回収率を示したが、Diol は他の CAs 代謝物は抽出せずに MHPG のみを特異的に分離することができた (Table 2)。

さらに、尿サンプルを用いて、これら3種類のカートリッジで分離した場合としない場合のクロマトグラムを Fig. 3 (遊離 MHPG) 及び Fig. 4 (総 MHPG) に示した。この結果、Silica や CN よりも Diol で処理することにより他の尿中に存在する物質と MHPG とを明確に分離し検出できるようになった。

一方、3種類の IS 候補の化合物はいずれも良好な回収率を示したが、VAI は尿中に存在するため、o-VAI は溶離時間が遅かったため、また、溶出時間が iso-VAI と重なる物質が尿中には存在しなかったため、iso-VAI が IS として最適であることが分かった。

3. MHPG の確認

励起波長を 280 nm に固定し、蛍光波長を 320 nm, 335 nm, 350 nm に変え、それぞれの波長でのクロマトグラムのピークの高さを比較し、320 nm に対する 335 nm 及び 350 nm のピーク高の比を求めた。MHPG, IS (iso-VAI) とともに 335 nm 時のピーク高は 320 nm の約 64%, 350 nm では約 40% であった。これは蛍光分光光度計で各物質の蛍光スペクトルを測定した時の比とほぼ一致していた (Table 3).

Table 3. Comparison of Fluorescence Intensity at 320, 335 and 350 nm

	Ratio of fluorescence intensity			
	335 nm/320 nm		350 nm/320 nm	
	MHPG	iso-VAI	MHPG	iso-VAI
By HPLC (Peak height)				
Authentic standard (before extraction)	0.63	0.59	0.35	0.33
Authentic standard (after extraction)	0.61	0.61	0.34	0.36
Urinary unconjugated MHPG	0.69	0.61	0.42	0.36
Urinary total MHPG	0.64	0.64	0.50	0.34
By spectrofluorometer				
Authentic standard	0.63	0.62	0.32	0.31

Excitation wavelength was 280 nm.

Table 4. Recovery Test of the Extraction Procedure

	Added (nmol/ml)		Determined (nmol/ml)	Calculated (nmol/ml)	Recovery (%)
	MHPG	MHPG-SO ₄			
Unconjugated MHPG	—	—	1.29	—	—
	1.0	—	1.85	2.29	80.8
	4.0	—	5.30	5.29	100.2
Total MHPG	—	—	3.69	—	—
	1.0	—	4.11	4.69	87.6
	4.0	—	7.37	7.69	95.8
	—	1.69	5.72	5.38	106.3
	—	4.99	8.16	8.68	94.0

Table 5. Human Urinary MHPG Concentration of 5 Healthy Adults

	Unconjugated MHPG		Total MHPG	
	nmol/ml	mmol/mol creatinine	nmol/ml	mmol/mol creatinine
Sample 1	1.29	0.15	13.43	1.51
Sample 2	1.28	0.14	17.32	1.87
Sample 3	0.87	0.10	6.13	0.69
Sample 4	2.06	0.24	20.16	2.35
Sample 5	2.59	0.31	14.64	1.73
Mean	1.62	0.19	14.34	1.63
S.D.	0.69	0.09	5.27	0.61

また、MHPG はグリコール骨格を持つため、 NaIO_4 によりグリコール部分の C-C 結合が酸化・切断される。そこで、尿サンプルに 10% NaIO_4 を加えて処理した後に HPLC で分析したところ、MHPG のピークは完全に消失した。

4. 添加回収試験

尿に標準 MHPG (4 nmol/ml, 1 nmol/ml) 又は標準 MHPG- SO_4 (約 5 nmol/ml, 1.7 nmol/ml) を加えたものと加えないものを測定し、添加回収率を求めた (Table 4)。

5. MHPG の尿中濃度

今回確立した方法で健常男性 5 名の尿を測定したところ、遊離 MHPG は 1.62 ± 0.69 nmol/ml (mean $\pm$ S.D.), 総 MHPG は 14.34 ± 5.27 nmol/ml (同) であった (Table 5)。

考 察

MHPG は NA 及び A の代謝物の 1 つであるが、主要代謝物である VMA やその他の CAs 代謝物 (HVA, DOPAC) のような酸性化合物ではないため、これらの代謝物と同時に分離し、定量するのが困難であった。CAs 代謝物の抽出は、酸性下において酢酸エチルによる液/液抽出が行われていた。一般に抽出時の pH が 1—2 でないと MHPG の回収率は極度に低いと言われていたが、今回の MHPG の標準品を用いた結果では、酸性よりも中性で有機溶媒による抽出を行った場合の方が回収率が高かった (Table 1)。今回著者らが行った溶媒抽出においては、回収率が過去の報告よりも低かったが、これは夾雑物の多い尿検体でなく、標準物質を用いたため、抽出する時に行った振盪によって空気酸化され、分解されてしまった可能性が考えられる。尿を用いた場合には何らかの尿成分が酸化分解を抑えるためか回収率は高くなった (データ未発表)。

今回確立した新しい抽出法の特徴は、Sep-Pak Diol を用いたことである。サンプル中の MHPG は水とともに Diol に保持され、酢酸エチルによる溶出によって、他の CAs 代謝物と完全に分離することができた。HPLC を用いることで、少量のサンプルでも MHPG の持つ自然蛍光を利用して測定することができ、蛍光体への誘導化は必要なかった。

Sep-Pak Diol は、通常水溶液には使用しない順相系の固相である。順相系抽出においては、水は最高の極性を有する抽出溶媒であり、これを最初にカートリッジに添加することから考えて、本研究の抽出法は本来の順相系固相抽出とは言い難い。事実、アプライした 0.2 ml のサンプルはすべて Sep-Pak Diol の充填剤に吸着された。本法ではサンプルの吸着後に酢酸エチルを用いて溶出しているが、これはシリカゲル担体表面に固定された水溶液と酢酸エチルの間で液/液抽出が起き、水相が固定されていることによって、高い回収率が得られた可能性が考えられた。しかし、充填剤の表面処理の違いによって、特異性や回収率に違いが生じること (Table 2) は、これだけでは説明できない。

一方、水も分離対象物質の 1 つと考えると、通常の順相固相抽出と同じであると言える。すなわち、水は極性が高いため強く担体に吸着されており、水よりも極性が低く、担体への吸着の弱い MHPG や IS が酢酸エチルによって溶出したと考えることができる。また、充填剤の表面処理の違いによって MHPG や夾雑物に対する吸着特性が異なり、Sep-Pak Diol の充填剤が、MHPG の特異的な抽出に最も適していたことも説明できる。ただし、なぜ Sep-Pak Diol が最適であったかについては、今のところ不明である。

これまで、固相抽出による MHPG の分離法はいくつか報告されている。Bond-Elut C18 を用いた血漿中 MHPG の分離法での回収率は、MHPG = 60.88%, IS (VAI) = 95.70% であった。¹³⁾

また, Karege は Bond-Elut PH を用いて尿中 MHPG の分離を行った結果, 回収率は $80 \pm 2.4\%$, 酢酸エチル抽出による回収率は $93 \pm 16\%$ と酢酸エチル抽出時の回収率の方が高かったが, 同時に C.V. も高かったと報告している.¹⁴⁾ 同じ Bond-Elut PH を用いた Semba らの方法では, 固相抽出を行った後, 再度酢酸エチルで抽出を行っており, この時の回収率は, Bond-Elut PH では 90% , 酢酸エチル抽出では $70-75\%$ であった.¹⁵⁾ これらの逆相固相抽出法を用いた時の回収率は酢酸エチルによる液/液抽出よりも高い. しかし, Sep-Pak Diol を用いた本研究の結果 (MHPG = 92.2% , IS (iso-VAI) = 93.2%) は, これらの逆相固相抽出の結果よりもさらに高い回収率を示した. また, Sep-Pak Diol を用いた抽出法は, MHPG に対して高い特異性を持っており, 一段階の抽出で十分であった.

本研究における尿中 MHPG 濃度 (Table 5) より, 重量濃度及び 1 日量 (クレアチニン排泄を 1.5 g/d と仮定) を計算すると, 遊離 MHPG は $0.37 \pm 0.14 \text{ mg/l}$ 及び $0.56 \pm 0.23 \text{ mg/24 h}$ (mean $\pm$ S.D.), 総 MHPG は $3.26 \pm 1.07 \text{ mg/l}$ 及び $4.91 \pm 1.64 \text{ mg/24 h}$ (同) となった. これを今まで報告された値と比較すると, 遊離 MHPG については Bourdeaux らの報告¹⁶⁾ では $0.12 \pm 0.05 \text{ mg/l}$ (記述無し), Filser ら¹⁷⁾ では $158 \pm 86 \mu\text{g/24 h}$ (mean $\pm$ S.D.), Peyrin ら¹⁸⁾ では $128 \pm 11 \mu\text{g/24 h}$ (mean $\pm$ S.E.) といずれの値よりも我々の値の方が高値を示した. また, 総 MHPG についてはそれぞれ $3.20 \pm 1.07 \text{ mg/l}$, $2937 \pm 980 \mu\text{g/24 h}$, $1935 \pm 189 \mu\text{g/24 h}$ であり, Bourdeaux らの値とは一致していたが, 他の著者の値よりもやはり高値であった. これらの報告では, いずれも酢酸エチルによる液/液抽出を行い, HPLC-ECD で測定していた. 本研究では例数が少ないため断定はできないが, 従来値が低かったのは, 抽出時の空気酸化による分解等の影響を受けた可能性があると考えられた.

尿中 MHPG は VMA とともに NA の主要代謝産物であることから, NA 作働性神経の活動状態を反映し, その活動状態の指標と考えられている. しかし, MHPG は, これまで測定が比較的困難だったため, 尿中 MHPG の生理学的意義や, その由来については未だに明確ではないと思われる. また, 精神科領域¹⁹⁾ や, 小児癌のスクリーニング^{20,21)} 等でも MHPG 量を測定する必要性が認められているが, 今回報告した MHPG の新しい固相抽出法は, 高い回収率と特異性を持ち, さらに操作が簡便であることから, 今後 MHPG の研究に大変有用な方法であると考えられた. なお, 本研究では, 尿中 MHPG について測定を行ったが, この新しい前処理方法は, 血漿中や脳脊髄液中の MHPG 量の測定にも応用できる可能性が考えられた.

結 論

MHPG は中性の化合物であるため, 他の CAs 酸性代謝物と同様の方法では十分な回収率と特異性が得られなかった. しかし, 順相系の固定相である Sep-Pak Diol によって保持され, 酢酸エチルによる有機溶媒抽出によって尿中の他の CAs 代謝物と完全に分離し測定することができた. 本法は他の抽出法に比べ, 高い特異性と回収率を示した.

引 用 文 献

- 1) Kopin I. J., *Psychopathology*, **17**, 83—97 (1984).
- 2) a) Sawada T., Kidowaki T., Sakamoto I., Hashida T., Matsumura T., Nakagawa M., Kusunoki T., *Cancer*, **53**, 2731—2735 (1984); b) Sawada T., Hirayama M., Nakata T., Takeda T., Takasugi N., Mori T., Maeda K., Koide R., Hanawa Y., Tsunoda A., Shimizu K., Nagahara N., Yamamoto K., *Lancet*, **4**, 271—273 (1984).

- 3) Johnsonbaugh R. E., Cahill R., *Pediatrics*, **56**, 267—270 (1975).
- 4) Muscettola G., Potter W. Z., Pickar D., Goodin F. K., *Arch. Gen. Psychiatry*, **41**, 337—342 (1984).
- 5) Peyrin L., *J. Neural Transm.*, **80**, 51—65 (1990).
- 6) Krstulovic A. M., Zakaria M., Lohse K., Bertani-dziedzic L., *J. Chromatogr.*, **186**, 733—748 (1979).
- 7) 宮川富三雄, 蛋白核酸酵素, **26**, 1089—1098 (1981).
- 8) a) Wilk S., Gitlow S. E., Clarke D. D., Paley D. H., *Clin. Chim. Acta*, **16**, 403—408 (1967);
b) Bond P. A., Howlett D. R., *Biochem. Med.*, **10**, 219—228 (1974); c) Karoum F., Lefevre H., Bigelow L. B., Costa E., *Clin. Chim. Acta*, **43**, 127—137 (1973).
- 9) a) Muscettola G., Potter W. Z., Gordon E. K., Goodwin F. K., *Psychiatry Res.*, **4**, 267—276 (1981); b) Agren H., *ibid.*, **6**, 185—196 (1982); c) Murray S., Baillie T. A., Davies D. S., *J. Chromatogr.*, **143**, 541—551 (1977).
- 10) Meek J. L., Neff N. H., *Br. J. Pharmacol.*, **45**, 435—441 (1972).
- 11) von Euler, U. S. Floding, *Acta Physiol. Scand.*, **33**, 57—62 (1955).
- 12) Duggan D. E., Bowman R. L., Brodie B. B., Udenfriend S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **68**, 1—14 (1957).
- 13) Minegishi A., Ishizaki T., *J. Chromatogr.*, **311**, 51—57 (1984).
- 14) Karege F., *J. Chromatogr.*, **311**, 361—368 (1984).
- 15) Semba J., Watanabe A., Takahashi R., *Clin. Chim. Acta*, **152**, 185—192 (1985).
- 16) Bourdeaux R., Capolaghi B., Lacroix C., Younos C., Lehr P. R., *J. Chromatogr.*, **665**, 45—51 (1995).
- 17) Filser J. G., Koch S., Fischer M., Muller W. E., *J. Chromatogr.*, **493**, 275—286 (1989).
- 18) Peyrin L., Pequignot J. M., *Psychopharmacology*, **79**, 16—20 (1983).
- 19) Filser J. G., Spira J., Fischer M., Gattaz W. F., Muller W. E., *J. Psychiatr. Res.*, **22**, 171—181 (1988).
- 20) 武田武夫, 高杉信男, 医学のあゆみ, **164**, 628—630 (1993).
- 21) 花井潤師, 川合常明, 佐藤 稔, 清水良夫, 菊地由生子, 高杉信男, 武田武夫, 小児がん, **27**, 26 (1990).