

液体クロマトグラフィーによる尿中カテコール アミンの直接定量法

中 村 互 志
杉 本 忠 則
小 宮 克 夫
山 崎 重 雄

Direct Determination of Catecholamine in Urine by Liquid Chromatography

Hiroshi NAKAMURA
Tadanori SUGIMOTO
Katsuo KOMIYA
Shigeo YAMAZAKI

A new type of automatic LC analyzer for urinary catecholamine has been developed. Owing to its built-in double column structure, the body fluid samples require no prepurification and reproducibility is satisfactory. Under the optimum conditions, the samples are completely separated into components within *ca.* 40 min. and each component can be determined with an accuracy of *ca.* 10^{-12} mol. by an electrochemical detection system.

1. はじめに

近年、カテコールアミン (CA) と多くの疾病との関連が急速に明らかにされてきた。¹⁾ CAには主に Adrenalin (AD or E), Noradrenalin (NA or NE) および Dopamine (DA) の3つの成分が知られている*。(Fig. 1)

これらの成分の生体中濃度の測定は生合成および代謝系の異常の判定、疾病の診断にとって重要な意味があり、CAの総量でなく各分量を測定する必要がある (Table 1)。多種成分の分離定量には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いるのが適当と考えられる。

HPLCによるCA各成分の分離定量には3つの課題が考えられる。すなわち、1) サンプルの前処理、2) カラム上での分離条件、3) 検出方法である。

対象となるサンプルは臨床データ用には尿、血清、脊髄液であり、研究用では各種組織の抽出液等の生体試料であるので、CA含有量は極端に希薄 (10^{-9} ~ 10^{-12}

mol/ml) であり夾雑物も多種多量である。このためHPLCのカラムに注入する以前にサンプルに対して濃縮、粗分離を手操作により長時間煩雑な前処理をほどこす必要がある。代表的なサンプルである尿を用いる際の、従来の方法による前処理を Scheme 1 に示す。

この前処理の煩雑さが、CA研究の進行を防げる原因となっているので、今般開発のシステムは可能な限り前処理の手間を省略できるように、ダブルカラムシステムを採用している。

自動濃縮、粗分離用システムを組み込んであっても、生体試料中には薬剤投与の影響などが新たに生じて、クロマトグラム上に予期せぬピークの出現し、目的ピークに重なり、測定を妨害することがある。これらのことに対応できるようにCAおよび妨害物質の保持挙動を充分に調べて、CA成分の分離条件を決定する必要がある。

CAの検出方法は2, 3知られており²⁾、それぞれ特徴がある。今回の研究には最近開発された電気化学検出器EC-8 (東洋曹達社製) を用いた。この検出器の特

*: DOPAはアミノ酸の一種であるが、類縁化合物としてCAに入れることもある。

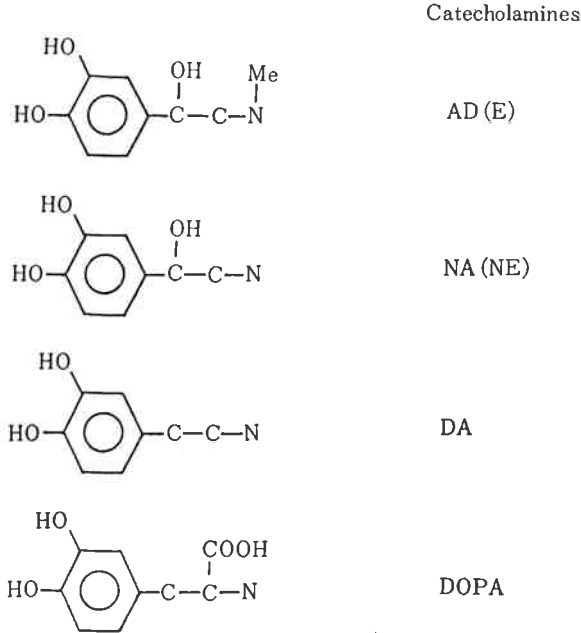
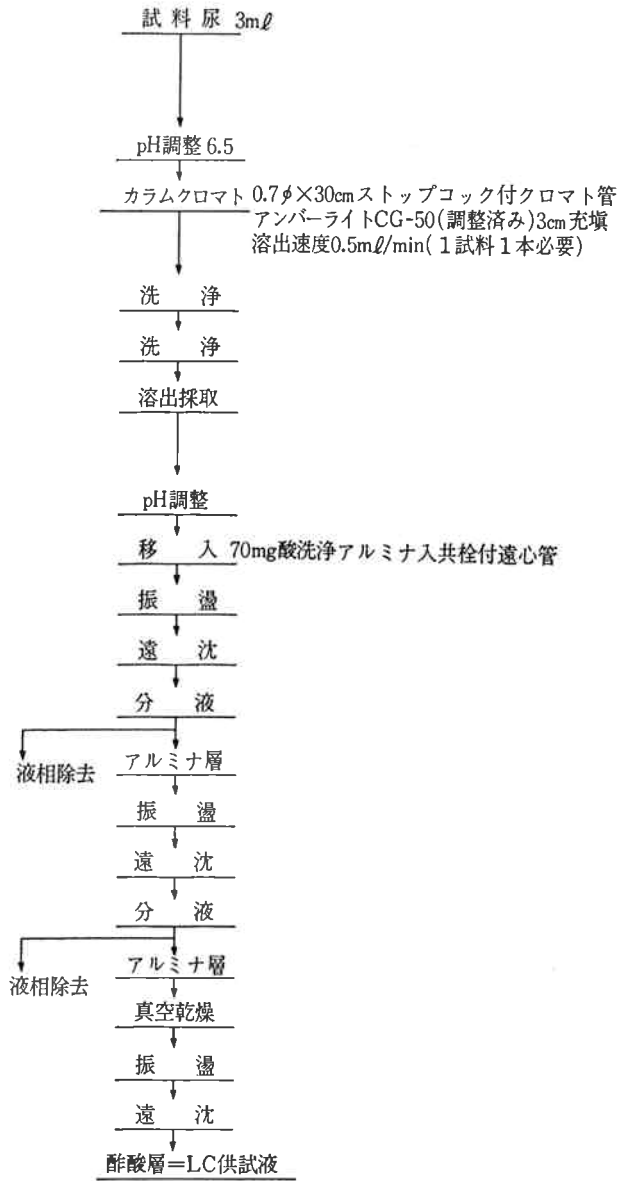


Fig. 1 Structures and abbreviation of catecholamines
 AD(E) : adrenalin (epinephrine)
 NA(NE) : noradrenalin (norepinephrine)
 DA : dopamine
 DOPA : 3, 4-dihydroxyphenylalanine

Table 1 Catecholamine secretion and related sickness

疾患	CA分泌
癌・腫瘍 クローム親和細胞腫 交換神経芽細胞腫 Chemadectoma	(卅) NA > AD (卅) (卅)
内分泌 甲状腺機能亢進症 甲状腺機能低下症 糖尿病	NA (卅) (卅) AD (卅)
循環器 心不全 (NCA) 心筋硬塞 脳出血 脳血栓 くも膜下出血 本態性低血圧 Shy-Drager 症候群	(卅) (+) (+) (+) (+) NA (-) NA (-)
神経症 フェニルケトン尿症 急性分裂症 躁症 脳腫瘍	(-) (+) (+) (+)
その他 肝炎, 肝硬変 リウマチ 白血病	(+) (-) (+)



Scheme 1 Preparation of sample from urine

徴は、運転操作が容易なこと、感度の良好なることがあげられる。欠点としては、試料中の多量の成分を検出し、クロマトグラム上に多くのピークを出現させることである。

2. 原理と装置

実験に使用した流路図を **Fig. 2** に示す。COLUMN-Cは試料中のCAを選択的に補集するためのカラム、COLUMN-AはCA成分を分離するためのカラムである。

〔1〕 ほう酸ゲル

カラムCには、できるだけカテコール類を選択的に補集する充填剤を使用する必要がある。ほう酸イオンはカテコール類、シスジオール類などと弱アルカリ性条件下

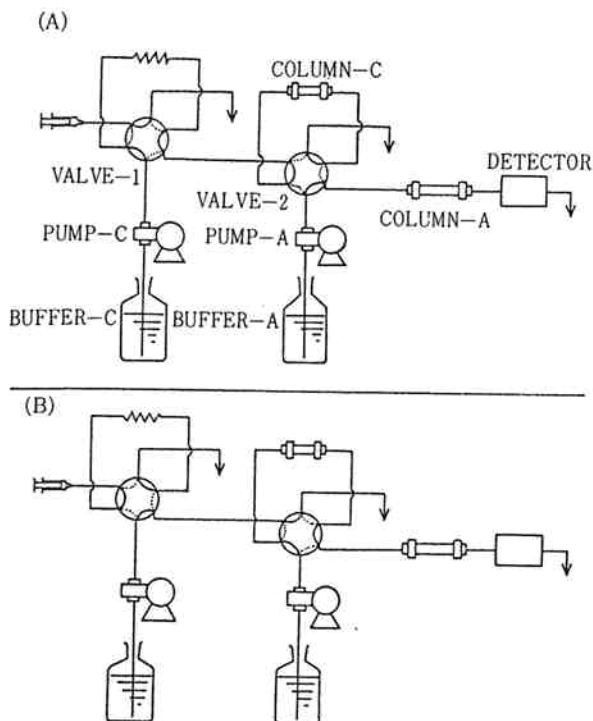


Fig. 2 Schematic diagram of sample enrichment for liquid chromatography

で錯形成をし、酸性条件下で錯解離をすることが知られている³⁾。この性質を利用するホウ酸を高分子基体に共有結合させたCA選択補集用ゲルが市販されており、実際に使用されている⁴⁾。しかしながらこれらはいずれも軟質ゲルであり、HPLC用にはとうてい使用には耐えない。このために新しい硬質ホウ酸ゲルを開発した。

用いた base gel は TSK-GEL・PWタイプであり、これに数次の反応を経てホウ酸を共有結合により導入した。この硬質ホウ酸ゲルを内径 3 mm, 長さ 50mm のカラムに充填し COLUMN-C として用いた。

〔2〕 装置

装置は 2 系列の流路から構成されており、いずれのバルブもモータードライブバルブである。まず VALVE-1 のループにサンプルを満たしたのち、スイッチを ON にすると、VALVE-1 が切り換わり、サンプルは COLUMN-C に負荷される。BUFFER-C が一定時間これを洗浄した後、センサーの指令信号により VALVE-2 が切り換わり、それまで直接 COLUMN-A に流れ込んでいた BUFFER-A は COLUMN-C を通過してから COLUMN-A に流れ込む。(Fig. 2 の下部参照) これにより COLUMN-C 上端に選択的に濃縮された CA は COLUMN-A 内に導入される。その後、センサーの指令信号により VALVE-2 は再びもとの状態にもどる。COLUMN-A 上で各成分に分離された後から溶出した CA 成分は電気化学検出器により検出さ

れる。

電気化学検出器の CA 検出原理を Fig. 3 に示す。CA の水酸基を電気化学的に酸化するとき流れる電流変化を測定するのが検出原理であるが、これはポーラログラフィーの原理と同じである。

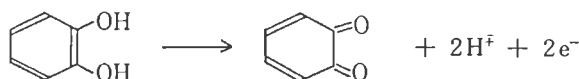


Fig. 3 The oxidation mechanism in electrochemical cell

COLUMN-A には種々の充填剤が使用できるが、COLUMN-C からの制約があり、pH の低い溶離液を使用しなければならない。この目的に合致する充填剤として LS-410 (東洋曹達社製) を用いて検討した。

3. 実 験

〔1〕 ホウ酸ゲルと BUFFER-C

ホウ酸ゲル充填の COLUMN-C を Fig. 2 の装置に組み込み、一定量の CA をサンプルとして用いて、CA 補集条件を検討した。

(1) COLUMN-C を流れる BUFFER-C (0.4M, トリスリン酸溶液) の pH が CA 補集能に与える影響を調べた。Fig. 4 にその結果を示す。

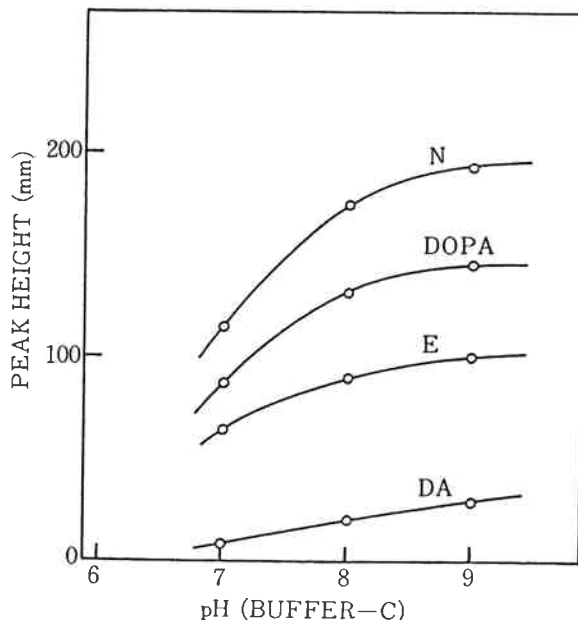


Fig. 4 Peak height of catecholamins vs pH of eluent

(2) ついで pH 8.5 の BUFFER-C の塩濃度変化が CA 補集能に与える影響を調べた。Fig. 5 にその結果

を示す。

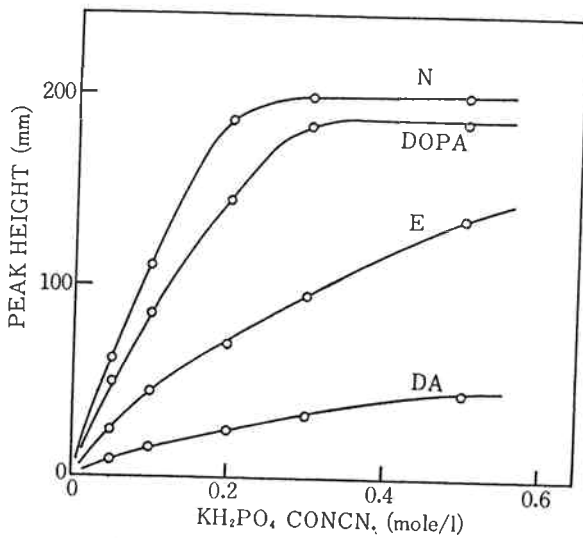


Fig. 5 Peak height of catecholamines vs. concentration of KH_2PO_4 in eluent

(3) 0.4, pH 8.6, トリスリン酸溶液を BUFFER-C として用いた際の, COLUMN-C の CA 補集容量を調べる目的でサンプル中の CA 量を変化させて測定した。

Fig. 6 にその結果を示す。

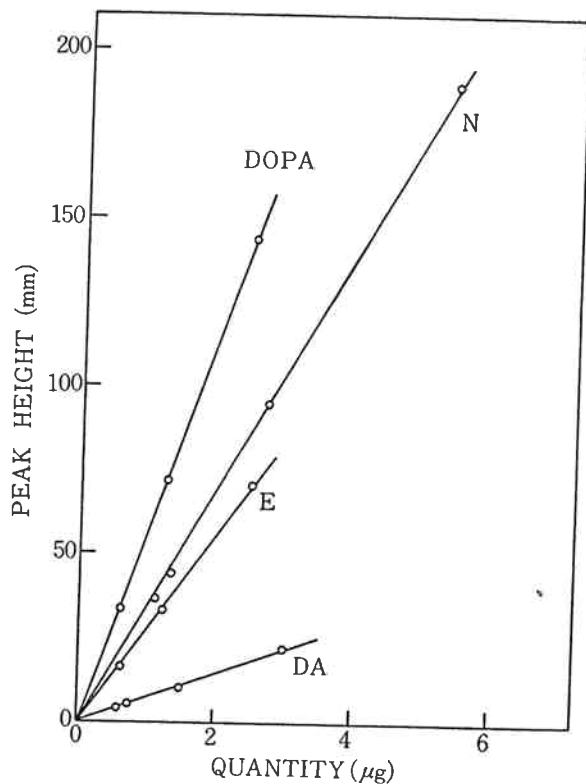


Fig. 6 Peak height vs. Feeding quantity of catecholamines

〔2〕 COLUMN-A と BUFFER-A

内径 4 mm, 長さ 250 mm のカラムに LS-410ゲルを充填し, COLUMN-A とし, BUFFER-A の pH を変化させた際の CA の保持容積変化を調べた。用いた溶液は 0.5M リン酸カリウムバッファーである。Fig 7 にその結果を示す。

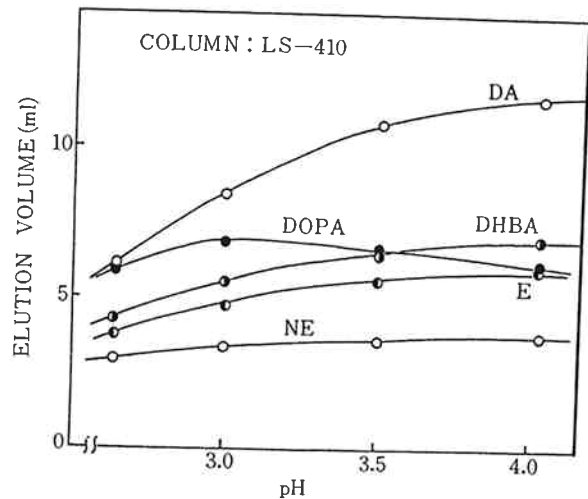


Fig. 7 Dependence of retention volume of catecholamines on pH of eluent

〔3〕 サンプル体積と実サンプルの測定

(1) VALVE-1 のループ体積を 1 ml にしたときと 5 ml にしたときの結果を Fig. 8 に示す。

(2) CA のスタンダードサンプルによるクロマトグラムを Fig. 9 に示す。人尿を酢酸エチルなどで洗ってサンプルとした場合に得られるクロマトグラムを Fig. 10 に示す。Scheme 2 に前処理方法を示す。

4. 結果と考察

〔1〕

Fig. 4 に示された結果では pH 8 以上で CA は, COLUMN-C に補集されるが, pH 7 以下はサンプル中の CA は一部 COLUMN-C より流出し, ピーク高さを減少する。これは弱アルカリ性条件下で CA は H^+ を放出し, gel 上のホウ酸イオンと錯形成をするが, 酸性下では錯解離が進行するからと考えられる。(Fig. 11) このため BUFFER-C の pH は 8.6 が, また BUFFER-A の pH は 2~3 をもちいた。

Fig. 5 は BUFFER-C の塩濃度の大きくなる時, CA はホウ酸ゲルによく補集されることを示している。これは錯形成時にはホウ酸は -1 価の陰イオンであり, CA も -2 価の陰イオンであるため陰イオン同志の反発が起るが, この反発は周囲にお相手イオンとして陽イオン

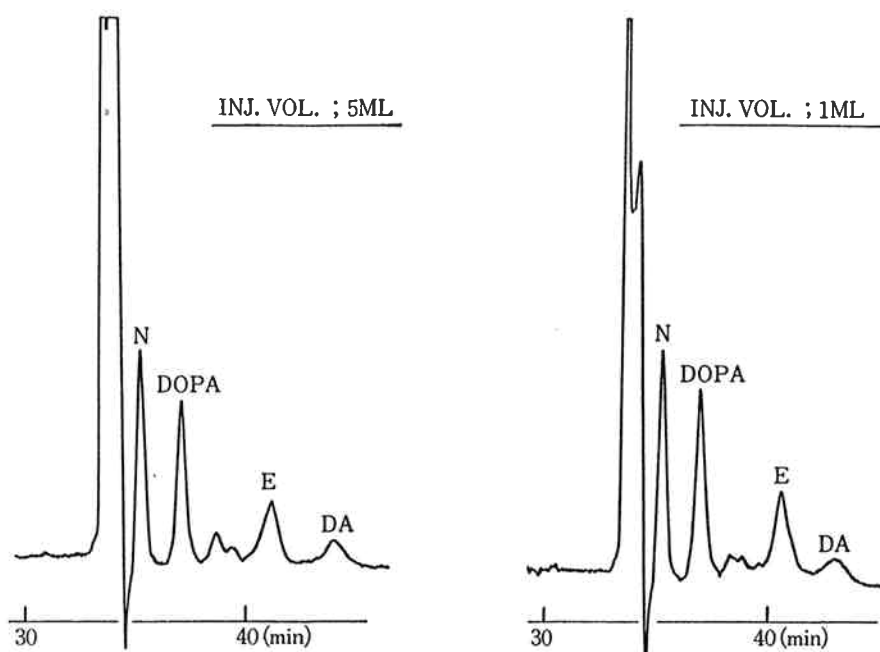


Fig. 8 Influence on feeding volume over chromatograms

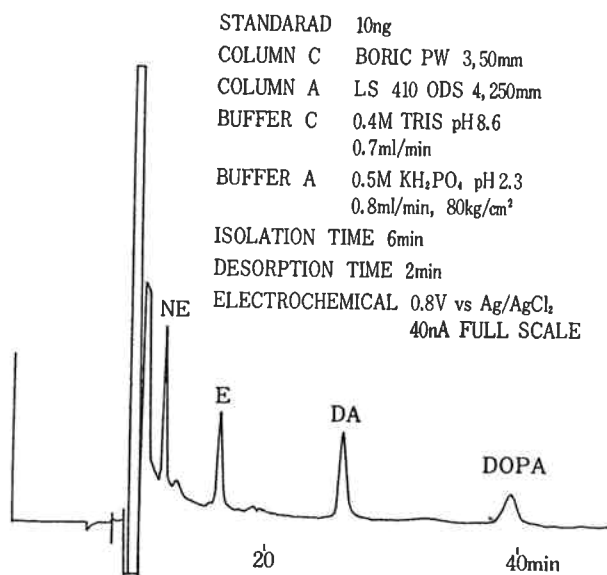


Fig. 9 Chromatogram of the standard sample

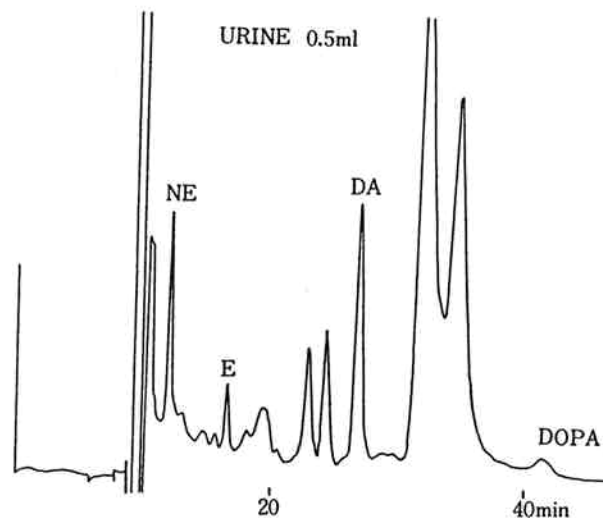


Fig. 10 Chromatogram of the urine

SAMPLE PREPARATION

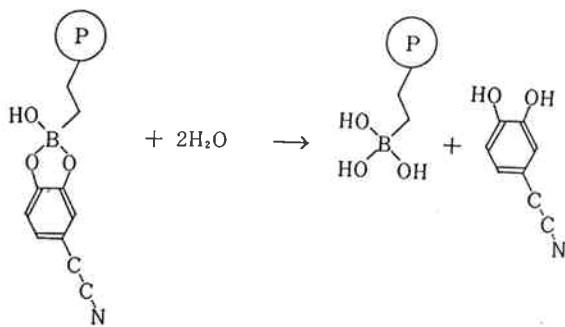
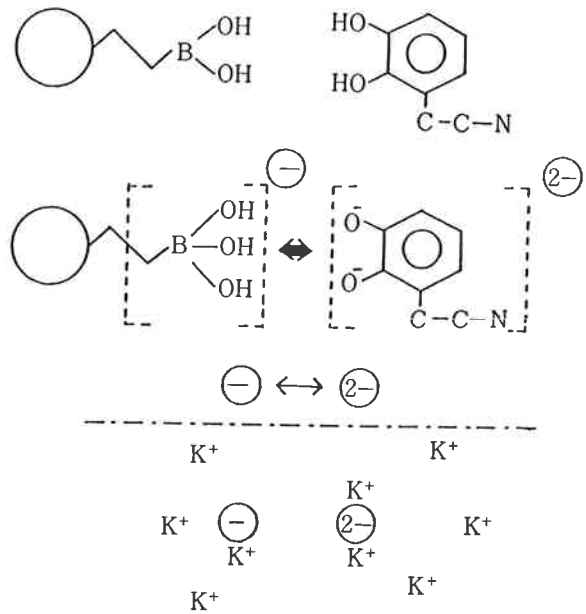
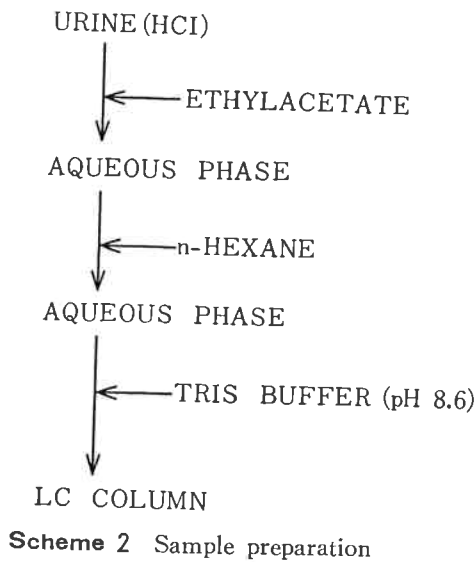


Fig. 11 Schematic for hydrolysis of catecholamine boron complex

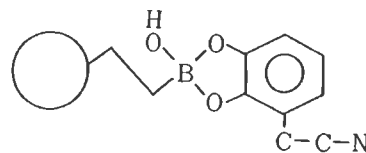


Fig. 12 Schematic for formation of catecholamine boron complex in salt solution with high concentration

(K⁺, Na⁺, NH₄⁺, Tris⁺, etc) が濃く存在するほど減少し、錯形成しやすいからであると考えられる*⁵⁾ (Fig. 12)

Fig. 6 はホウ酸ゲルのCA補集能が 5 μg 以上あることを示している。通常、人尿 1 ml 中のCAは 0.5 μg 以下であり血清では 10 ng 以下であるので、COLUMN-C の補集能は充分であると考えられる⁶⁾。

〔2〕

Fig. 7 に与えられた結果から、BUFFER-A の pH としては時間を短縮する面からは2.3~2.7付近が望ましいことがわかる。また BUFFER-A の塩濃度が大であるのは塩析効果によりCA類の保持容積を増大することを期待したためである。

〔3〕

以上の考察から、Fig. 9 に示した条件を決定した。

ISOLATION TIME とは COLUMN-C に負荷されたサンプル中の不純物を BUFFER-C が洗い流している時間である。CAは弱アルカリ性下で分解しやすいため無用に長時間洗うことは、回収率の点から不利であるので6分とした。DESORPTION TIME とは BUFFER-A が COLUMN-C 上のCAを脱離させる時間で、その間バルブは Fig. 2 の下図の状態を保ち、後上図の状態にもどる。

Fig. 8 はサンプル体積は 5 ml まで可能であることを示しており、これにより希薄なサンプルを濃縮できるので検出感度を増大できる。

5. 結 論

CA以外にかなりの成分が検出されるため、これらの妨害成分からの分離を完全に行う必要があるが、この装置により、アルミナ吸着のような面倒な前処理を行わずに、尿中のCAを直接分離、定量しえることがわかった。

*: 溶液中での同種荷電、すなわち正と正、負と負の組み合わせの、イオン同志の“出会い”は周囲のお相手イオンの存在で促進されることがPfeiffer 効果等でも見い出されている。

文 献

- 1) N. Kagihara, Y. Kobayashi; *Medicina*, **16**, 1958 (1979).
- 2) 田村, 石橋, 大倉, 谷村, 辻; “LC-けい光分析”, 講談社, (1978).
- 3) J. W. Mellor; “*A comprehensive Treatise on Inorganic and Theoretical Chemistry*”, **5**, London, (1980).
- 4) S. Higa, T. Suzuki, A. Hayashi, J. Tsuge, Y. Yamamura; *Anal. Biochem.*, **77**, 18 (1977).
- 5) K. Miyoshi, Y. Kuroda, Y. Yoneda; *J. Phys. Chem.*, **80**, 270 (1976).
- 6) 中野, 大森, 新保; “日本臨床”, **406**, 2299(1976). (1980).