

尿中のカテコールアミン代謝物の同時測定

栗 原 幸 忠
山 本 学
小 沢 由 佳
海 野 益 郎

Simultaneous Measurement of Catecholamine Metabolites in Urine by HPLC

Yukitada KURIHARA
Manabu YAMAMOTO
Yuka OZAWA
Masuo UMINO

Catecholamine metabolites, vanillylmandelic acid, 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid and 3-methoxy-4-hydroxyphenyl glycol (MHPG) in urine are measured simultaneously by the reverse phase chromatography.

MHPG which is released from 3-methoxy-4-sulfonyloxyphenyl glycol by Gulsulase treatment and others are extracted by ethylacetate and separated by the gradient elution mode on TSK-GEL LS-410 ODS.

High sensitive and relatively selective self-fluorescence and electrochemical detection methods are used.

TSK-GEL ODS を用いた逆相クロマトグラフィーにて尿中のカテコールアミン代謝物である Vanillylmandelic acid, 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol, 3, 4-Dihydroxyphenylacetic acid, そして Homovanillic acid の同時測定を行った。前処理として酢エチ抽出処理を行い、選択性の高い自己蛍光検出法及び電気化学検出法を用いた。3-Methoxy-4-sulfonyloxyphenyl glycol は酵素による加水分解処理を行って遊離型として測定を行った。前処理に用いた酢エチによる抽出率、酵素による加水分解条件等についても検討を行った。

1. はじめに

分析法の進歩、特に分離分析法の著しい進歩により神経伝達物質として臨床的に注目されているカテコールアミン (CA) と各種疾患との関係がより一層明らかにされようとしているが、前処理が自動化されたシステムの完成に伴い実用化の時代に入ったと思われる。一方、CA と同様に CA の代謝物である Vanillylmandelic acid

(VMA), 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG), 3, 4 Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) そして Homovanillic acid (HVA) 等も各種疾患との関係で重要視されつつあり、これらの代謝物の同時測定は情報量の多さから開発が期待されている分析法の一つと言えるだろう。これらの代謝物の同時測定には急速な発展を示している高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が適していると考え、分離モードとして TSK-GEL LS-410 ODS (LS-410A) を用いる逆相クロマトグラフィー (RPC) にて検討を行った。

RPC による尿中の CA 代謝物の測定例は、UV 法^{1), 2), 3), 4)}, 電気化学検出法^{5), 6), 7), 8)} と数多く報告されているが自己蛍光検出法による報告例は少ない。従って自己蛍光検出法と電気化学検出法を直列に使用して選択性の向上を計り、さらにトリプトファン代謝物で臨床的に重要視されている 5-Hydroxyindolacetic acid (5-HIAA) についても検討を行った。

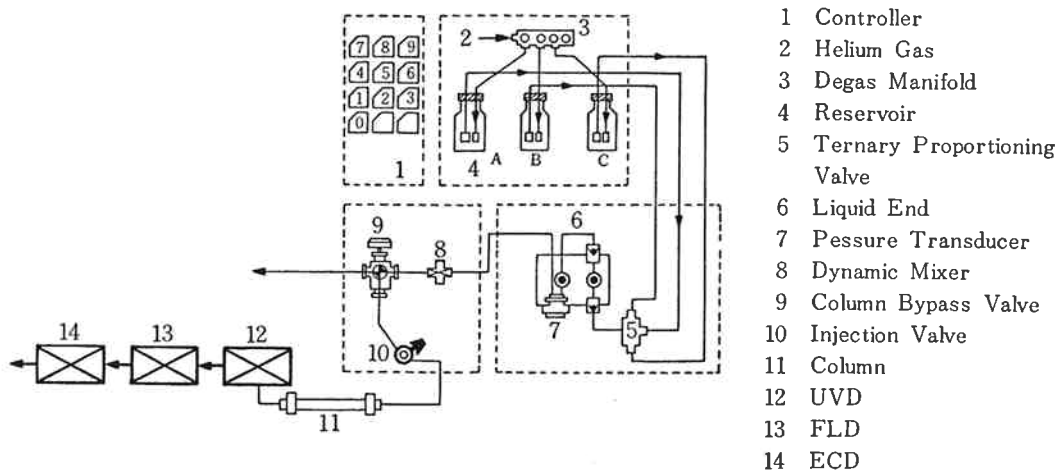


Fig. 1 Flow diagram of HPLC

2. 試薬および装置

〔1〕 試薬

VMA, HVA, DOPAC, MHPG (ピペラジン塩) は SIGMA 製を, そして MHPG-sulfate [3-Methoxy-4-sulfonyloxyphenylglycol は Fluka AG 製を用いた。溶離液に使用したアセトニトリルは自己蛍光検出法 (λ_{ex} , 220 nm) との関係で液体クロマトグラフィー用を用い, その他の試薬は市販品特級を使用した。酵素として SIGMA 製 Sulfatase (β -Glucuronidase) を使用した。

〔2〕 装置

高速液体クロマトグラフィーと付属品は, すべて東洋曹達製のものを使用した。ポンプシステムとして三液のグラジェント溶出法が可能である SP-8700 (ヘリウムデガッサー付き) に重水素放電管を光源として使用できる蛍光検出器 FS-970, および作用電極にグラッシーカーボンを用いた電気化学検出器 EC-8 を直列につないで用い必要に応じ波長可変フロー型光度計 UV-8 をも直列につないで用いた。Fig. 1 に装置の流路系を示した。

〔3〕 充てん剤

RPC 用充てん剤である化学結合型ポーラスシリカゲル TSK-GEL LS-410 ODS (粒径 5μ) を用いた。(内径 4 mm, 長さ 30 cm のステンレス製カラムに充てんされ市販されている)

3. 実験および考察

〔1〕 HPLC 条件設定について

CA の代謝物そして 5-HIAA の化学構造を Fig. 2 に示す。Fig. 2 より明らかなように MHPG を除く他の化合物はカルボキシル基を有しているために, その保

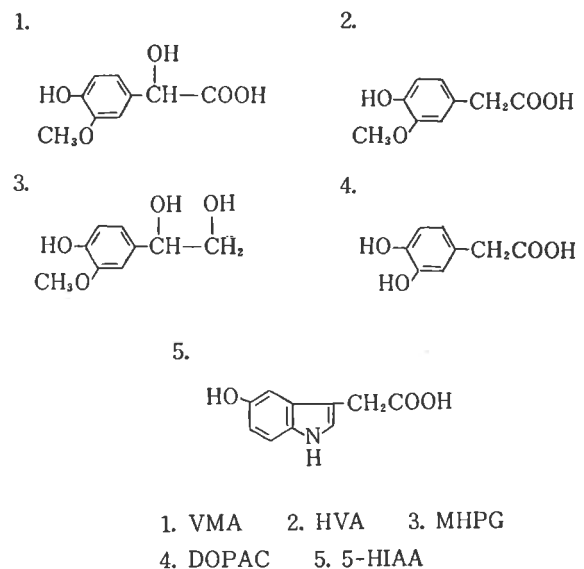


Fig. 2 Structures of CA Metabolites and 5-HIAA

持容量 (溶出容量) は溶離液の水溶性有機溶媒濃度の他に溶離液の pH にも影響を受ける。尿中には, 目的成分以外に多量の成分 (紫外吸収物質) が存在しているために妨害成分との分離には, 有機溶媒濃度の影響の他に有機溶媒の種類そして緩衝液濃度と pH, 添加する塩濃度について考慮する必要がある。

条件設定の難易度は前処理の精度¹¹⁾にも依存しており実際は前処理との関係で設定条件が変化する。尿中には紫外吸収成分が多量に存在しているために目的成分に対し選択性の高い検出器を用いた方が前処理および分離条件の設定が比較的容易となる場合が多い。

Fig. 3 に UV 検出法 (280 nm), 低波長励起蛍光検出法 (NFL λ_{ex} 220 nm, λ_{em} $>$ 340 nm) そして電気化学検出法 (ECD, 印加電圧 800 mV) を用いた時の前処理

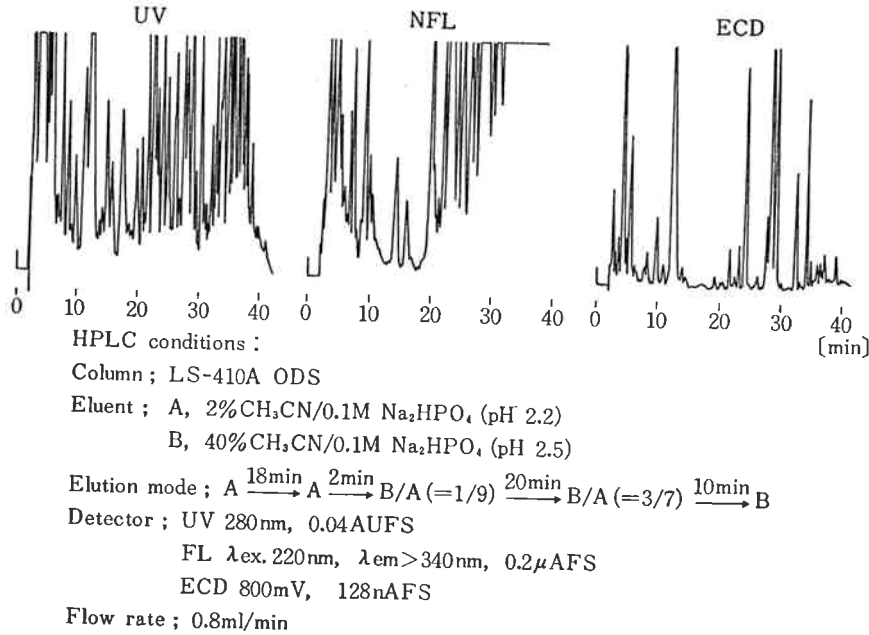


Fig. 3 Chromatograms of Urine on LS-410 ODS

を施さない尿のクロマトグラムを示す。

UV 280 nm より UV 210 nm の方が感度的には有利であるが選択性は低下する。しかし、ECD および NFL は感度的⁹⁾にもさらに選択性⁹⁾においても有利であり特に複雑な成分系の試料の検出には忘れてはならない検出法と言えるであろう。

〔2〕 前処理

Procedure

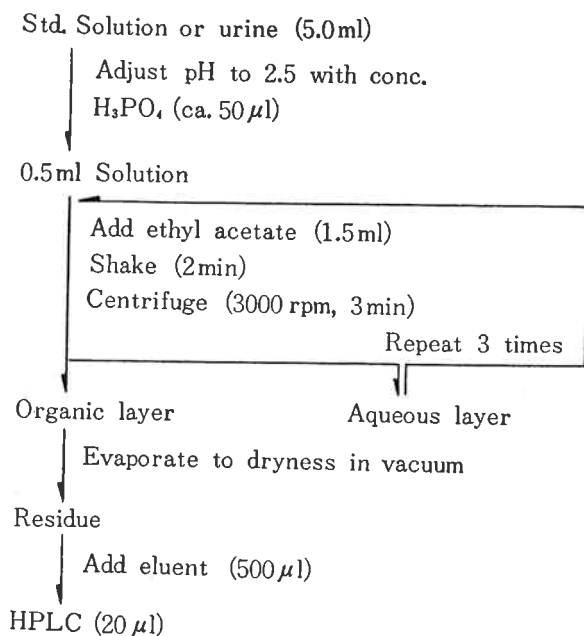


Fig. 4 Pretreatment of urine

Table 1 Ethyl acetate extraction rate of CA metabolites and 5-HIAA

| Sample | Recovery (%) | C. V. (%) |
|--------|--------------|-----------|
| VMA | 96 | 4.3 |
| MHPG | 90 | 4.3 |
| DOPAC | 85 | 3.2 |
| 5-HIAA | 53 | 4.8 |
| HVA | 98 | 2.7 |

尿の分析において抽出処理が汎用されているが、特に CA の代謝物の前処理として、酸性での酢酸エチルエステル (酢エチ) 抽出操作を用いた報告^{1),5),6),7),8)}が多い。しかし抽出回数、抽出液の後処理、回収率等について不明な点が多いので、標準試料による酢エチ抽出処理の回収率について検討を行った。Fig. 4 に操作法を、Table 1 に回収率と変動係数を示した。抽出回数および1回に用いる酢エチ量の増加により回収率が向上したが、抽出液の後処理として窒素気流中で蒸発乾固する方法と真空乾燥法を比較したところ、前者は回収率が大きく変動した。吹き出す窒素の流速の問題と思われるが、再現性の点で問題があり、安定した結果が得られる真空乾燥法を採用した。

〔3〕 酵素処理

ノルエピネフィリン (NE) の主な代謝物である MHPG は尿中で遊離型の他に抱合型として見いだされており、MHPG の測定には抱合型を遊離型とする必要がある。一般に Glusulase (sulfatase と glucuronidase

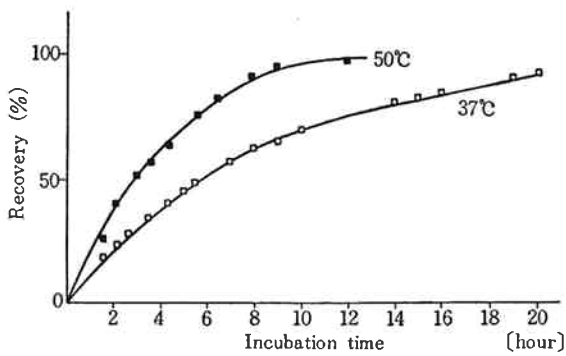


Fig. 5 Deconjugation time of MHPG sulfate with glucosylase

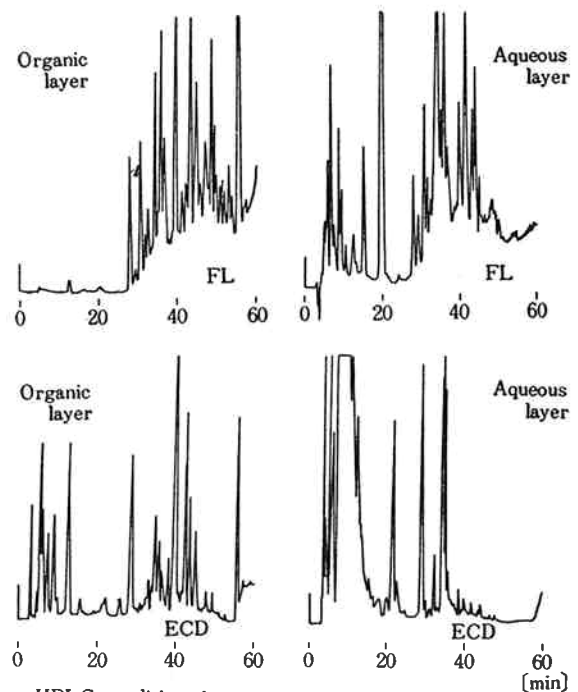
の混合物)を用いた加水分解処理が行われている。^{7),8)}
⁹⁾しかし Glucosylase 処理を行う場合の pH, 温度そして反応時間についても不明な点が多いために、標準試料(3-Methoxy-4-sulfonyloxyphenylglycol : MHPG-sulfate)を用いて加水分解条件について検討を行った。MHPG-sulfate の 10 $\mu\text{g/ml}$ 水溶液の pH を 5.0 から 6.5 と変化させ 37°C で 20 時間反応させた結果、ほとんど差が認められなかった。従って pH 5.5 での反応温度と反応時間について MHPG-sulfate の加水分解率を当量の MHPG を標準として検討した。(Fig. 5)。反応温度が高い程、反応時間が短くて良いことが理解できる。MHPG-sulfate は MHPG の 4 位の水酸基が硫酸エステルとなっているために ECD そして NFL に対し応答を示さない。従って微量の MHPG-sulfate の測定における酵素処理は検出感度をあげる点においても重要である。操作を簡単にする目的で Glucosylase はスパーテルにて約 50 mg 添加することとした。

[4] 尿への応用

尿のように複雑な試料の測定においては、分析時間の点でグラジエント溶出法を用いた方が有利である。

グラジエントモード、初期条件および最終条件は前処理との関係で設定すべきである。前処理として酢エチ抽出処理を施した場合の水層と有機層のクロマトグラムを Fig. 6 に示した。図から明らかなように比較的簡単な前処理により水溶性の高い成分 (RPC において速く溶出する成分) の除去が可能となっていることが理解できる。従って尿の酢エチ抽出成分の測定条件について検討を行った。グラジエントモードを一定とした時の溶離液の pH を 2.1 から 3.5 に変化させた時の各成分の溶出容量の変化を Fig. 7 に示した。カルボキシル基を持たない MHPG 以外の成分は pH が高くなる程、すなわちカルボキシル基の解離が進む程、溶出容量が少なくなっている。

各 pH において尿の酢エチ抽出成分の測定を行い目



HPLC conditions :

Column ; LS-410A ODS

Eluent ; A, 2%CH₃CN/0.15M Na₂HPO₄ (pH 3.0)

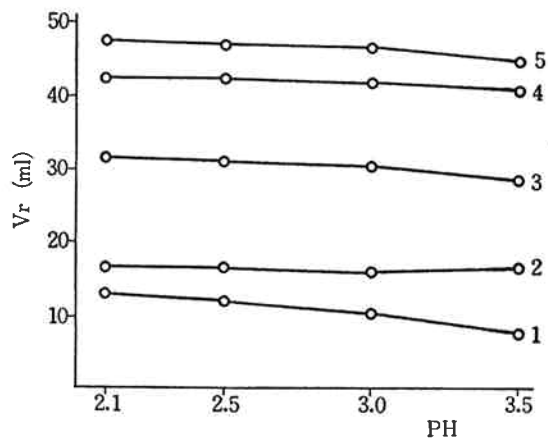
B, 40%CH₃CN/0.2M Na₂HPO₄ (pH 3.0)

Elution mode ; A $\xrightarrow{15\text{min}}$ A $\xrightarrow{45\text{min}}$ B/A (=35/65) $\xrightarrow{10\text{min}}$ B

Detector ; FL λ_{ex} 220nm, λ_{em} >340nm, 0.2 μ AFS
 ECD 950mV, 64nAFS

Flow rate ; 0.8ml/min

Fig. 6 Chromatograms of a normal urine treated with ethyl acetate



Sample ; 1. VMA, 2. MHPG, 3. DOPAC, 4. 5-HIAA, 5. HVA

HPLC conditions :

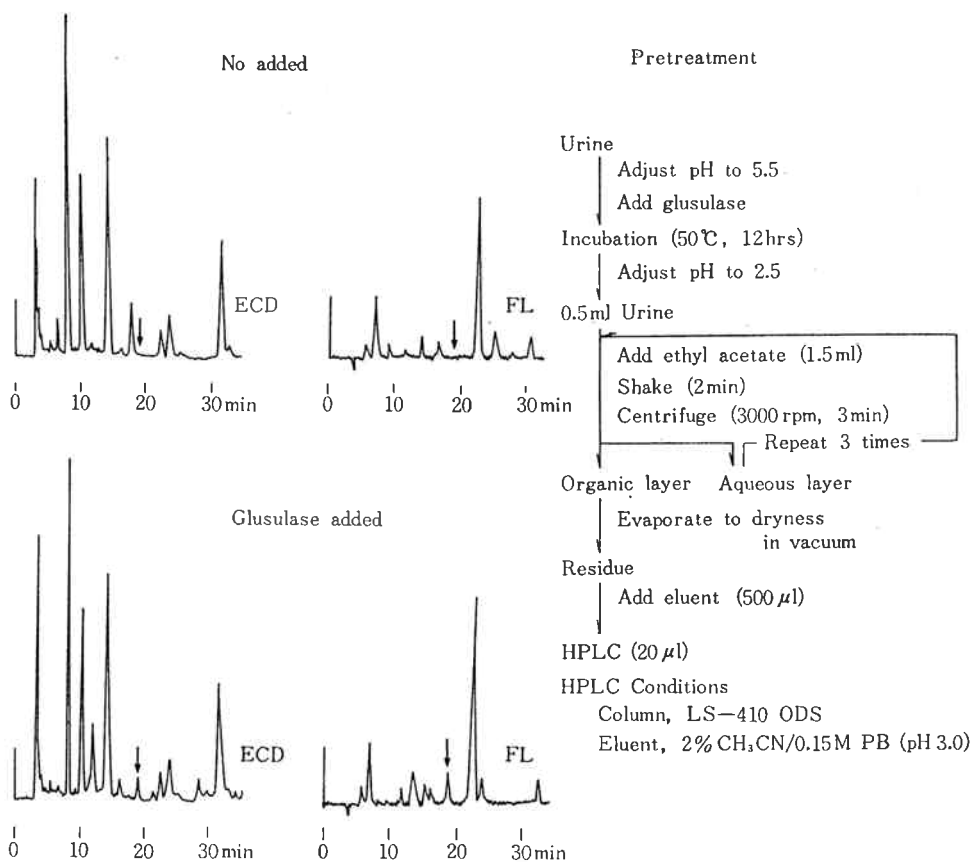
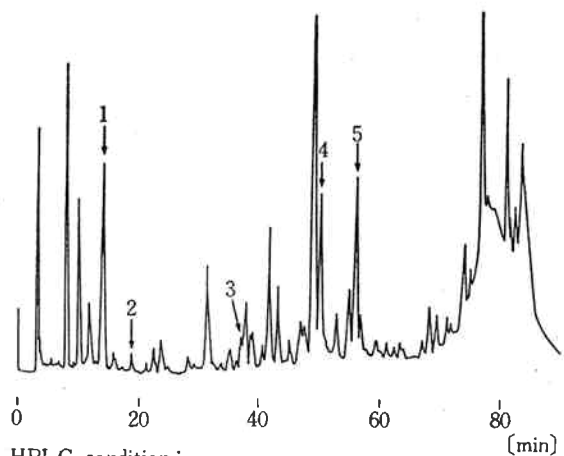
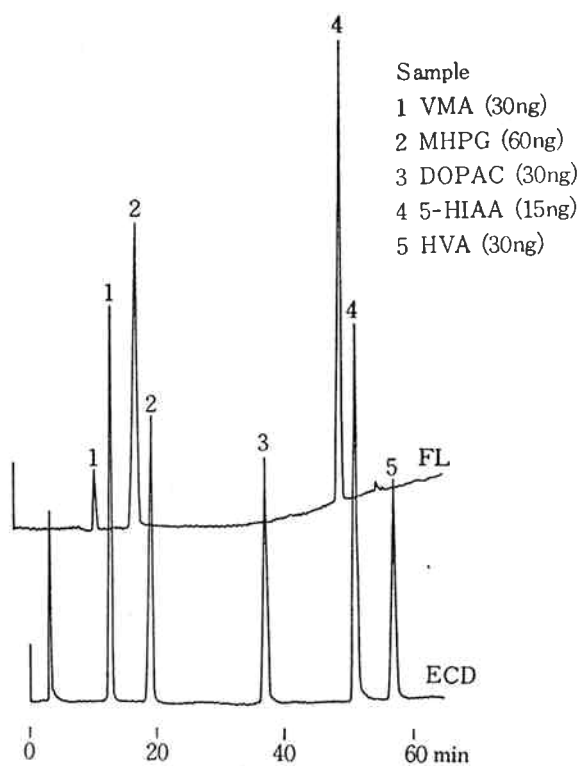
Column ; LS-410 ODS

Eluent ; A, 2%CH₃CN/0.15M Na₂HPO₄

B, 40%CH₃CN/0.2M Na₂HPO₄

Elution mode ; A $\xrightarrow{15\text{min}}$ A $\xrightarrow{45\text{min}}$ B/A (=35/65) $\xrightarrow{10\text{min}}$ B

Fig. 7 Dependence of pH on elution volume of CA metabolites and 5-HIAA



的成分が単離される pH, アセトニトリル濃度そしてグラジェントモードの設定を行った。Fig. 8-1, Fig. 8-2 にその一例を示した。標準のクロマトグラムが Fig. 8-1 尿の酢エチ抽出成分のクロマトグラムが Fig. 8-2 である。MHPG および 5-HIAA は NFL に感度良く検出されているが, ECD との併用により保持時間による同定だけでなく, それぞれの検出器に対する応答 (ピークの高さ) からも同定精度をあげることが可能である。図から明らかのように DOPAC の単離が不十分であり 5 成分の同時測定が達成されていない点不満である。しかし, 酢エチ抽出処理と選択性の比較的高い ECD そして RPC との組み合わせの限界かと思われる程, 尿には多くの成分が含まれていることを示しており, 尿分析の困難さを示しているとも言える。患者尿は服用した薬物あるいは薬物の代謝成分も含まれることが考えられるので, ますます同時測定が困難となる傾向にある。

Fig. 9 に Glusulase 処理の有無によるクロマトグラムの違いを示した。MHPG は, この条件で可能と思われるが, アニオン性成分である VMA, DOPAC, 5-HIAA そして HVA の同時測定はアニオン交換クロマトグラフィー (AEC) の適応が可能である。従って MHPG は RPC が, 他の成分は AEC が好ましい分離モードとも思えるが, 前処理を含め同時測定について, ひきつづき検討を行う予定である。

文 献

- 1) 柴戸光子, 後藤 潮, 黒田吉男, 荒川規矩男; “臨床化学”, 5(4), 385 (1977).
- 2) J. Seki, Y. Arakawa, K. Imai, Z. Tamura, S. Yoshine, Y. Mizuno, K. Yamada, M. Matsue, H. Narabayashi; *Chem. Pharm. Bull.*, 29(3), 789 (1981).
- 3) L. M. Bertani-Dziedzic, A. M. Krstulovic, S. Ciriello, S. E. Gitlow; *J. Chromatogr.*, 164, 345 (1979).
- 4) A. Yoshida, M. Yoshioka, T. Sakai, Z. Tamura; *J. Chromatogr.*, 227, 162 (1982).
- 5) M. H. Joseph, B. V. Kadam, D. Risby; *J. Chromatogr.*, 226, 361 (1981).
- 6) P. Moleman, J. J. M. Borstrok; *J. Chromatogr.*, 227, 391 (1982).
- 7) R. Alonso, C. J. Gibson, J. McGill; *Life Science*, 29, 1689 (1981).
- 8) A. M. Krstulovic, M. Zakaria, L. Bertani-Dziedzic; *J. Chromatogr.*, 186, 733 (1979).
- 9) J. T. Taylor, S. Freeman, P. Brewer; *Clin. Chem.*, 27, 173 (1981).
- 10) C. D. Kilts, G. E. Breese, P. B. Mailman; *J. Chromatogr.*, 225, 347 (1981).