

# 全自動カテコールアミン分析計 HLC-8030 の開発

岩	枝	俊	直
黒	木	美	佳
大	田	和	彦
石	村	茂	樹
高	橋	裕	明
渡	辺	秀	夫

## Development of Fully Automated Catecholamine Analyzer, HLC-8030

Toshinao IWAEDA  
Mika KUROKI  
Kazuhiko OHTA  
Shigeki ISHIMURA  
Hiroaki TAKAHASHI  
Hideo WATANABE

We have developed a simple, highly sensitive and fully automated analyzer for catecholamines (epinephrine, norepinephrine and dopamine) based on the post column high-performance liquid chromatography using DPE (diphenylethylenediamine) as a fluorogenic reagent. Owing to a three-column HPLC system based on the microprocessor controlled column-switching device, catecholamines in deproteinized plasma or urine, were analyzed within 30 min with good recovery (90% or more) and good reproducibility (c. v. 3%).

### 1. はじめに

神経系伝達物質として重要な役割を持つ3種のカテコールアミン(ドーパミン; DA, ノルエピネフリン; NE, エピネフリン; E)の測定は、疾病の診断、治療に役立っているが、血中成分の測定はその代謝速度が速く、微量しか存在しないため極めて難しい。現在、代表的な測定法である HPLC-電気化学検出法<sup>1)</sup>では、カテコールアミン類に対する選択性が悪く、複雑な前処理を必要とするため測定に熟練を要し、自動化が容易なトリヒドロキシインドール (THI) 法<sup>2)</sup>においては、ドーパミンの感度が著しく低く、血中濃度を測定することは極めて困難である。

最近、カテコールアミン3成分に対して高感度な発蛍

光試薬、ジフェニルエチレンジアミン (DPE) が開発された<sup>3) 4)</sup>。DPE は3成分いずれに対しても反応し、高い蛍光強度を持っているが、THI に比較すると若干選択性が悪い。選択性の向上のために、吸着特性の異なる2つの充填剤を使用したデュアルトラップ自動前処理法を採用し、DPE による全自動カテコールアミン分析計を開発した。この分析計では、除蛋白された血漿をオートサンプラに設置すれば、自動的にカテコールアミン3成分を同時に測定できる。

### 2. 装置概観

HLC-8030 の外観図を Fig. 1 に、流路系統図を Fig. 2 に示すように、装置は、操作パネル、オートサンプラを備えた本体とポンプ、ディガッサを備えた送液ユニ

ットから成り立っている。横幅は合わせて 112 cm, 奥行きは 63 cm であるため普通の事務机に乗る大きさである。

各機能部品の特徴と仕様は以下の通りである。

### (1) ディガッサ

オンラインの 6 連真空脱気装置で内容量約 40 ml のテフロンチューブを通して溶離液の脱気を行なっている。

### (2) 送液ポンプ

前処理液, 分析液用として 2 つの SUS ヘッド, 反応液用として 2 つの樹脂ヘッドを持った 4 連プランジャポ

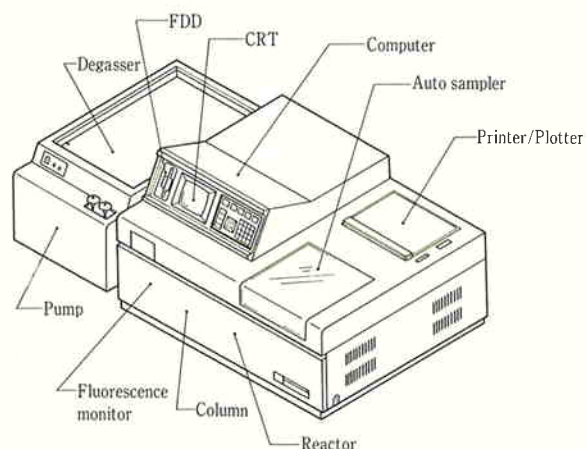


Fig. 1 HLC-8030

ンプを使用し, 溶媒切替え用の 3 方電磁弁 4 コを組合せることにより 6 種類の溶媒を送液している。

### (3) オートサンプラ (AS-48)

ループ吸引方式で試料の最小必要容量は, ループ容量 (500  $\mu$ l) + 70  $\mu$ l である。セットできる試料点数は 48 点で, 現時点の分析サイクルでは 1 日分の測定試料点数に相当する。測定中の試料の変化を防ぐためにサンプルテーブルにはサーモジュール方式の冷却機構が付いている。その温度は, 17°C 前後に保ち結露が生じない程度に調節している。

### (4) 蛍光検出器 (FLD-02)

HLC-8030 用として開発した蛍光検出器で, 光源をキセノンランプとし, 励起側にバンドパスフィルタ, 蛍光側にカットオフフィルタを用いている。更に, セル容量を大きく (120  $\mu$ l) することにより高感度検出を可能にした。

DPE とカテコールアミンの反応生成物の蛍光特性は, E, NE, DA ともおおよそ励起極大波長が 340~350 nm 蛍光極大波長が 370~400 nm にあるため, 実際には, 励起側に 355 nm を吸収極大とするフィルタを, 蛍光側に 470 nm 以上を透過するフィルタを採用している。

### (5) 制御部

搭載したコンピュータは装置の制御とデータ処理を行う。制御内容はオートサンプラ, 各バルブの制御だけで

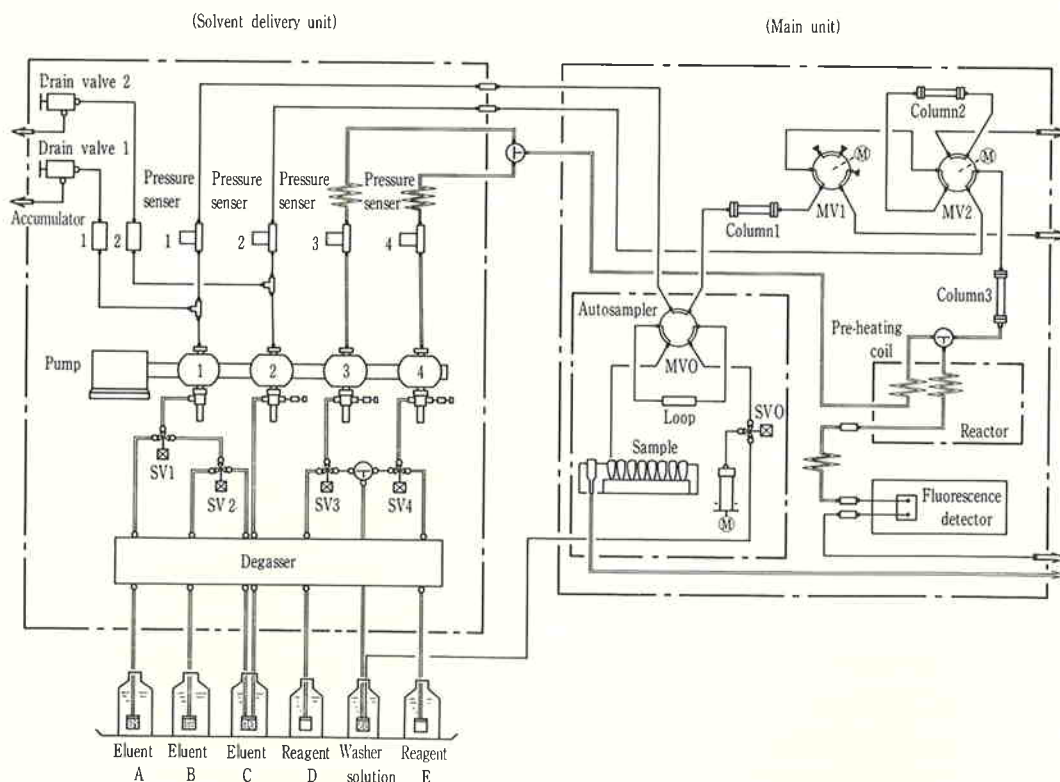


Fig. 2 Flow diagram

はなく、各機能部のモニタリングを行い異常の場合は、それぞれ異常に応じて各機能部品を停止させる。データ処理結果はプリンタ/プロッタに打ち出させる。打ち出し内容は生データの他、測定日時、試料 NO. 各成分の溶出時間、ピーク高さ、ピーク面積、定量結果である。また、これらのデータはフロッピーディスクに保存されるばかりでなく RS232C でホストコンピュータに送信できる。

(6) CRT (VDP-57X)

各制御、データ処理 FILE 内容および、システムの運転状態、エラーメッセージ等を表示する。各種パラメータの変更もテンキーを使用し、この画面で行なう。

(7) プリンタ/プロッタ

サーマルプリンタで、各測定結果の打ち出し、CRT画面のコピーが出来る。

(8) FDD (FD/1135)

各試料の生データを保存する。3.5インチのフロッピーディスクを用い約150点数の測定結果が保存できる。

3. 測定原理

Fig. 3 にカラムスイッチング法による試料前処理の

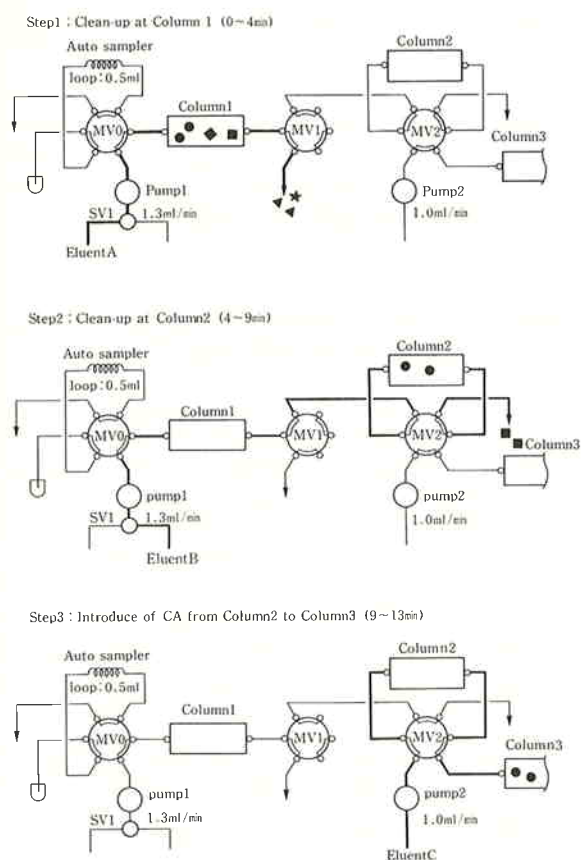


Fig. 3 Principle of on-line sample clean-up by dual trap technique

模式図を示す。オートサンプラに設置された試料はサンプルループを通して、第1前処理 (CA1) カラムに前処理液Aにより導入される。CA1 カラムは、エーテル系ゲルであるため弱い逆相系の性質をもつ。そこで、前処理液Aの pH を中性付近にすることによりカテコールアミンの解離を抑え CA1 カラムに疎水的に吸着させる。一方では、水溶性物質は流出除去されることになる (ステップ1)。CA1 カラムでの約4分間の前処理の後、溶媒切替用の三方電磁弁 (SV1) が作動し前処理液Bに替ると同時に、カラムスイッチング用のモータバルブ (MV1) が切替りカテコールアミン画分は第2前処理 (CA2) カラムに導かれる。CA2 カラムは陽イオン交換ゲルであるため、陰イオン性物質は流出除去されカテコールアミンなどの陽イオン性物質が吸着される (ステップ2)。更に約5分間の前処理の後、最後に、カラムスイッチング用のモータバルブ (MV2) が切替ることにより、3種のカテコールアミンは分析液Cにより CA2 カラムから分析 (CA3) カラムに導入され分離される (ステップ3)。

分離されたカテコールアミンは、反応コイル (0.4 φmm×30 m) にて DPE の 50%エタール溶液である反応液Dと酸化剤フェリシアン化カリウムを含む反応液Eと反応して発蛍光物質となり蛍光検出器で検出される。この反応機構は Fig. 4 のように考えられている。このときの反応温度と得られたクロマトグラムのピーク高さの関係は Fig. 5 のようであった。すなわち、E, NE は 90°C 付近で DA は110°C 付近で最高値に達した。そこで、3成分の同時分析では反応温度変化に対してなるべくゆるやかな応答性を示す 90°C に反応温度を設定した。

4. 試料調製法および測定条件

(1) 血漿

フタ付きサンプルカップ (容量 1.8 ml) に、EDTA とアスコルビン酸の入った試験管に採取した血漿 0.6

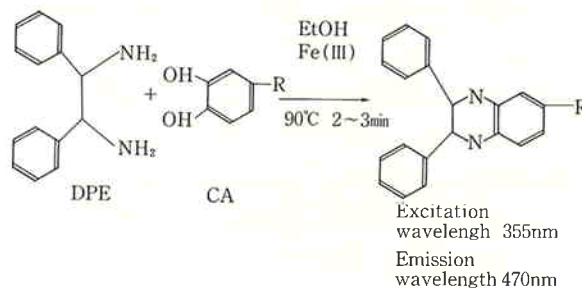


Fig. 4 Reaction mechanism of post-column DPE derivatization

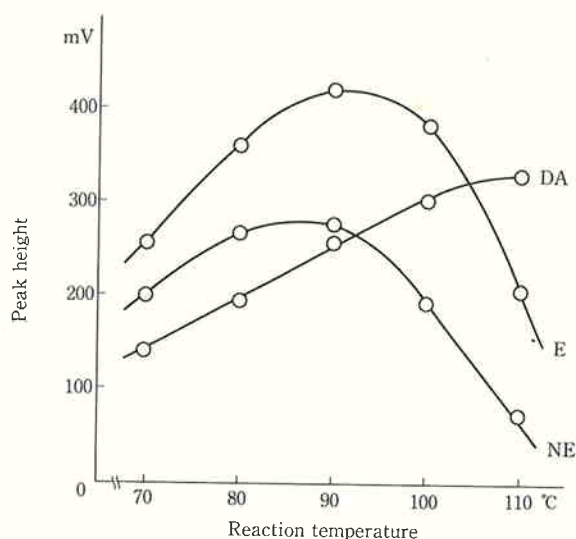


Fig. 5 Effect of reaction temperature on peak height

mℓ をとり、約 6% の過塩素酸 (60% 過塩素酸を 10 倍に希釈) を 0.3 mℓ 加え攪拌後、10,000 g、20 分間の冷却遠心分離を行ない、その上清 0.6 mℓ 以上をサンプルカップにとり測定試料とした。

#### 〔2〕 尿

スピッツ管に一時尿 10  $\mu$ ℓ をとり、約 2% の過塩素酸 (60% 過塩素酸を 30 倍に希釈) 2 mℓ を加え十分に攪拌後、その 0.6 mℓ 以上をサンプルカップにとり測定試料とした。

#### 〔3〕 標準試料

市販のカテコールアミン標準液 A (10  $\mu$ mol/mℓ, 片山化学) を購入し、最終濃度が 1 pmol/mℓ となるように、約 2% 過塩素酸 (60% 過塩素酸を 30 倍に希釈) で希釈した。

#### 〔4〕 カラム

CA1: TSK precolumn CA1 7.5  $\times$  75 mm

CA2: TSK precolumn CA2 4  $\times$  60 mm

CA3: TSK gel Catecholpak 6  $\times$  150 mm

#### 〔5〕 溶離液

すべて市販品 (東ソー) を使用した。各液の試薬成分は次の通りである。

前処理液 A: 過塩素酸ナトリウム, クエン酸ナトリウム, アジ化ナトリウム

前処理液 B: アセトニトリル, クエン酸ナトリウム

分析液 C: エタノール, 硝酸アンモニウム

反応液 D: DPE, エタノール

反応液 E: エタノール, フェリシアン化カリウム, ホウ酸, アスコルビン酸

## 5. 測定結果

### 〔1〕 直線性

Fig. 6 は以上の装置, 反応条件で得られたカテコールアミンの検量線を示している。人血漿中のカテコールアミン濃度付近での検量線であり, 原点を通る直線性が得られた。

なお, この条件で得られる各成分の検出限界は, E; 0.05 pmol/mℓ, NE; 0.08 pmol/mℓ, DA; 0.09 pmol/mℓ (S/N=3) であった。

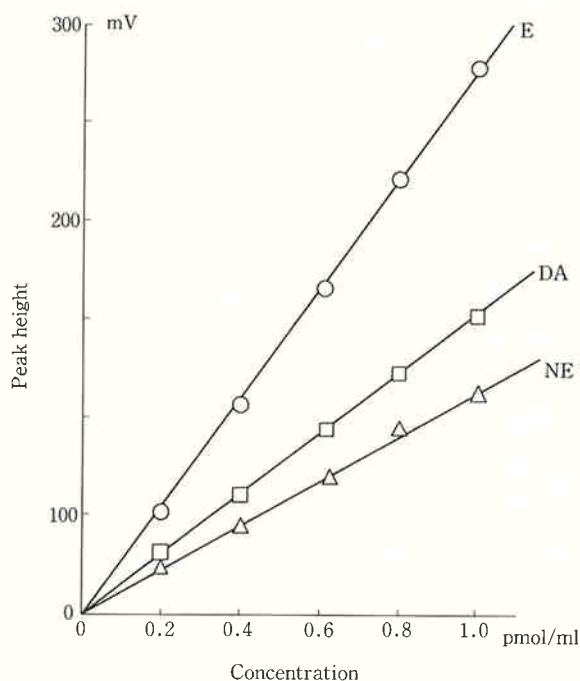


Fig. 6 Calibration curves of catecholamines

Table 1 Within run reproducibility of standard catecholamines assay

(n=16)

		R. TIME (min)	HEIGHT (mV)	AREA (mV·sec)
E	$\bar{x}$	25.7	472.7	18918
	SD	0.04	5.14	246.6
	CV (%)	0.2	1.1	1.3
NE	$\bar{x}$	28.8	260.1	12840
	SD	0.05	3.73	324.0
	CV (%)	0.2	1.4	2.5
DA	$\bar{x}$	32.0	240.2	10040
	SD	0.06	2.82	156.1
	CV (%)	0.2	1.2	1.6

STD: 1 mol/mℓ

Table 2 Within run reproducibility of urine assay

		(n=16)		
		R. TIME (min)	HEIGHT (mV)	AREA (mV·sec)
E	$\bar{x}$	26.0	64.5	2495
	SD	0.04	1.33	69.8
	CV (%)	0.2	2.1	2.8
NE	$\bar{x}$	29.1	228.6	11026
	SD	0.04	1.6	153.4
	CV (%)	0.2	0.7	1.4
DA	$\bar{x}$	32.2	813.9	35700
	SD	0.05	3.08	242.3
	CV (%)	0.2	0.4	0.7

\* Urine (diluted 200 times)

(2) 同時再現性

本装置で測定した保持時間, ピーク高さ, ピーク面積の各成分の同時再現性を, 標準液 (Table 1) と200倍希釈した尿試料 (Table 2) で示している。いずれも連続8時間の測定結果であるが, 保持時間でほぼ0.2%ピーク高さあるいはピーク面積で3%以下と非常に良好な結果が得られた。

(3) 添加回収率

血漿 1 ml に対し, カテコールアミンを 1 pmol ずつ添加した時の回収率を Table 3 に示している。3成分とも90%以上の添加回収率が得られた。

(4) クロマトグラム及び測定例

Fig. 7 に前記法で除蛋白した人血漿中のカテコールアミンの測定結果と, Fig. 8 に麻醉下腹部大動脈より採血したマウス血漿中カテコールアミンの測定結果のデータ打出し例を示している。いずれも, E, NE, DA の3成分が非常によく分離し, DA のうしろに未知ピークが見られるほかは, カテコールアミンの測定に影響するピークは見られなかった。しかし, DA 製剤などの薬

\*\*\* CATECHOLAMINE REPORT \*\*\* 87/08/19 11:34  
 SAMPLE NO. 08190006 DILUT 1.5

NAME	PMOL/ML	NG/ML	HEIGHT	AREA	R.TIME	M
E	0.16	0.029	19.4	799	25.00	B
NE	1.43	0.242	69.0	3629	28.21	B
DA	0.25	0.038	14.9	716	31.56	B

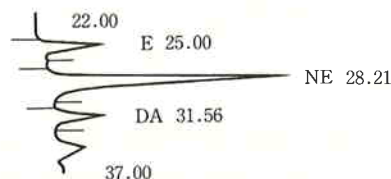


Fig. 7 Processing report of human plasma

\*\*\* CATECHOLAMINE REPORT \*\*\* 87/10/31 12:17  
 SAMPLE NO. 10300049 DILUT 4.5

NAME	PMOL/ML	NG/ML	HEIGHT*	AREA	R.TIME	M
E	2.96	0.543	94.1	3880	25.70	B
NE	14.91	2.523	175.5	9585	29.02	B
DA	1.27	0.194	20.7	1058	32.42	B

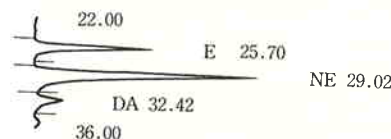


Fig. 8 Processing report of mouse plasma (obtained from the main artery in the adomen under anesthesia)

物の影響は十分予想されるため, 測定においては服薬中の薬剤には十分注意をしなければならない。

さらに, 健常人と思われる41名の血漿を, 測定した結果, E:0.27 pmol/ml, NE:1.62 pmol/ml, DA:0.22 pmol/ml の平均値が得られた。この測定値は諸家<sup>5)</sup> の測定値とほぼ一致するものであった。

6. ま と め

最近開発されたジフェニルエチレンジアミンを発蛍光試薬とし, 2つの性質の異なる充填剤を用いたデュアルトラップ方式を採用することにより, 人血漿中のカテ

Table 3 Recovery of catecholamines from plasma

		(n=9)		
		E	NE	DA
Recovery (%)		93.5±1.7	96.4±1.6	94.4±1.7
measured (pmol/ml)	with Std	1.13±0.02	2.47±0.04	1.14±0.02
	without Std	0.20	1.51	0.20

\* Plasma 1 ml + Std 1 pmol/ml

コールアミン3成分の自動前処理による高感度分析ができた。

さらに、オートサンプラ、各電磁バルブ、モータバルブをコンピュータでコントロールし、得られた信号をデータ処理することにより、カテコールアミン3成分の同時分析を自動化することができた。

## 6. おわりに

本装置の開発に当り、DPE 試薬によるポスト反応法の適用に快諾いただきいろいろと御助言を賜った九州大学薬学部大倉洋甫教授ならびに能田均博士に深謝致します。また、本装置のソフトおよびハード開発の初期段階

から尽力されてきた諸兄に感謝致します。

## 文 献

- 1) P.T. Kissinger, C.J. Refshauge, R. Dreiling and R. N. Adams; *Anal. Lett.*, **6**, 465 (1973)
- 2) A. Yamatodani and H. Wada; *Clin. Chem.*, **27**, 1983 (1981)
- 3) H. Nohta, A. Mitsui and Y. Ohkura; *Bunseki Kagaku*, **33**, E263 (1984)
- 4) H. Nohta, A. Mitsui and Y. Ohkura; *Anal. Chim. Acta*, **165**, 171 (1984)
- 5) "日本臨床"; 42巻・秋季臨時増刊号, 842 (1985)



著 者

氏名 岩 枝 俊 直  
Toshinao IWAEDA  
入社 昭和46年3月1日  
所属 科学計測事業部  
企画開発部  
ソフト開発室



著 者

氏名 黒 木 美 佳  
Mika KUROKI  
入社 昭和62年4月1日  
所属 昭和62年11月30日  
結婚退社



著 者

氏名 大 田 和 彦  
Kazuhiko OHTA  
入社 昭和54年3月16日  
所属 科学計測事業部  
企画開発部  
機器開発室



著 者

氏名 石 村 茂 樹  
Shigeki ISHIMURA  
入社 昭和47年4月1日  
所属 科学計測事業部  
企画開発部  
機器開発室



著 者

氏名 高 橋 裕 明  
Hiroaki TAKAHASHI  
入社 昭和57年12月1日  
所属 科学計測事業部  
企画開発部  
ソフト開発室  
主任研究員



著 者

氏名 渡 辺 秀 夫  
Hideo WATANABE  
入社 昭和40年4月12日  
所属 科学計測事業部  
企画開発部  
次長