

# 薬物干渉を回避したカテコールアミン測定方法

広 渡 祐 史  
坪 井 基 宏  
富 樫 理 美

## The Improved Determination of Catecholamines in Plasma with Automated Catecholamine Analyzer "HLC-725CA"

Yuji HIROWATARI  
Motohiro TUBOI  
Masami TOGASHI

Approximately three percents of plasma samples for catecholamines assay in Japan cannot be determined the amount of catecholamines by the regular analysis method with HLC-725CA. The analysis method of HLC-725CA consists of two pre-treatment columns and one separation column. We considered that therapeutic drugs and their metabolites in those samples interfered with separation of catecholamines. Adequate separation of catecholamines and interference substances has been achieved by using a reversed-phase column as the separation column instead of a cation-exchange column in the regular method.

### 1. 緒 言

全自動カテコールアミン分析計HLC-725CAは、エピネフリン (E)、ノリエピネフリン (NE)、ドーパミン (DA) のカテコールアミン3分画 (Fig. 1)

について測定する専用装置である。その測定原理は、2本の前処理カラムと1本の分離カラムを用いたカラムスイッチングシステムであり、分離カラムで分解した後、ジフェニルエチレンジアミン (DPE) と反応させ、その反応生成物を蛍光検出により高感度に測定

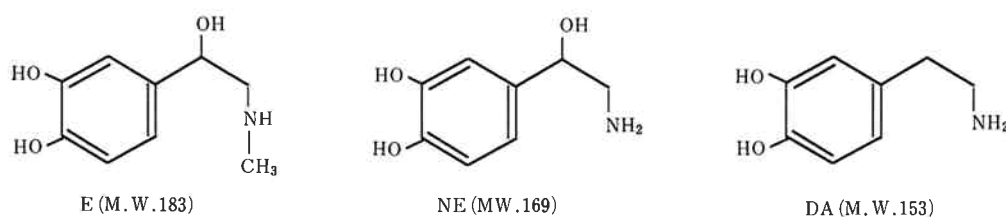


Fig. 1 Structures of catecholamines

E ; epinephrine  
NE ; norepinephrine  
DA ; dopamine  
M.W. ; molecular weight

することが出来る<sup>1,2)</sup>。

これらカテコールアミンは、アミノ酸であるL-チロシンからL-ドーパを経て、DA、NE、Eと生体内で生合成される生理活性アミンである。血液中、尿中のカテコールアミンの測定は、褐色芽細胞腫、神経芽細胞腫の診断に重要であることが知られており<sup>3,4)</sup>、また高血圧の病態解析にも用いられている。

従来の測定方法により血漿検体を測定すると、測定が不可能な検体が存在することが知られており、その原因は、患者に投与された薬物であると考えられている。今回、著者らは、測定方法を改良し、これら測定が不可能な血漿検体について測定が可能になったので報告する。

## 2. 方 法

### 〔1〕 測定試料

EDTA-2 Na採血管により採血し、その血漿600  $\mu$ l に6% (W/V) 過塩素酸溶液を300  $\mu$ l加え混合し、次に1.5M酢酸ナトリウム溶液を120  $\mu$ l加え混合する。遠心分離により得られた上清を測定試料とした。

### 〔2〕 測定装置

全自動カテコールアミン分析計HLC-725CA (東ソー株式会社製) をマニュアルに従い操作した。

### 〔3〕 カラムおよび溶離液

カラムおよび溶離液は、以下の東ソー株式会社製を用いた。

TSKprecolumn CA 1	7.5mmI.D. × 75mm
TSKprecolumn CA 1 HS	4.6mmI.D. × 35mm
TSKprecolumn CA 2	4.0mmI.D. × 60mm
TSKgel Catecholpak	6.0mmI.D. × 150mm
TSKgel ODS-80T <sub>M</sub>	6.0mmI.D. × 150mm

溶離液A

溶離液B

溶離液C

CAテスト「TOSOH」反応試薬D

CAテスト「TOSOH」反応液E

## 3. 測定原理

2本の前処理カラムと1本の分離カラムを用いたカラムスイッチングシステムである。分離カラムでカテコールアミン成分を分離した後、DPEと反応させ、その反応生成物を蛍光検出により測定する<sup>5,6)</sup>。

まず、1番目の前処理カラム(カラム1)に測定試料が導入され、吸着されない物質が除去される(ステッ

プ1)。次に、カテコールアミン成分は、2番目の前処理カラム(カラム2)に導かれ、吸着されない物質が除去されカテコールアミン成分のみがカラム2に吸着される(ステップ2)。さらに、カラムスイッチングにより、カラム2に吸着されたカテコールアミン成分が分離カラム(カラム3)に導かれ分離される(ステップ3)。分離カラムにより分離した後、DPEと酸化剤としてフェリシアネートイオンの存在化で加熱され、速やかにポストラベル化反応される(ステップ4)。反応生成物は励起極大波長340nm、蛍光極大波長を470nmに持つ蛍光物質であり<sup>7)</sup>、蛍光検出器により測定される。Fig. 2に測定原理の概要をステップごとに示した。

## 4. 結 果

従来の測定方法については、カラム1、カラム2、カラム3、それぞれTSKprecolumn CA 1、TSKprecolumn CA 2、TSKgel Catecholpakを用いた。弱い逆相カラムであるTSKprecolumn CA 1にて水溶性の成分を除去し、陽イオン交換カラムであるTSKprecolumn CA 2で陰イオン成分を除去する。分離カラム(カラム3)である陽イオン交換カラムTSKgel Catecholpakによりカテコールアミン成分は分離される。溶離液A、溶離液Bは、カラム1、2に使用する前処理を行う溶離液であり、溶離液Cはカラム3に使用するカテコールアミンを分離する溶離液である。装置の測定条件であるパラメーターはINJ. TIME-28.0min、SV1-ON4.0minOFF18.0min、SV2-ON0.0minOFF0.0min、MV1-OFF4.0min、MV2-ON9.0minOFF13.0minで行った。

改良した測定方法では、分離カラムであるカラム3を逆相カラムであるTSKgel ODS-80T<sub>M</sub>とした。カラム1は、同一のゲルを小さなカラムに充填したTSKprecolumn CA 1 HSを用いた。カラム2は、従来方法と同じTSKprecolumn CA 2を用いた。また、分離を行う溶離液については、溶離液Cの代わりに150mM硝酸ナトリウム、10mMオクチル硫酸ナトリウムを含む5mMリン酸ナトリウム緩衝液pH3.5の溶液を用いた。TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>(カラム3)を洗浄する溶離液として溶離液Bを用いた。装置の測定条件であるパラメーターはINJ. TIME-35.0min、SV1-ON23.0minOFF27.0min、SV2-ON38.0minOFF40.0min、MV1-OFF1.0min、MV2-ON5.5minOFF21.0minで行った。

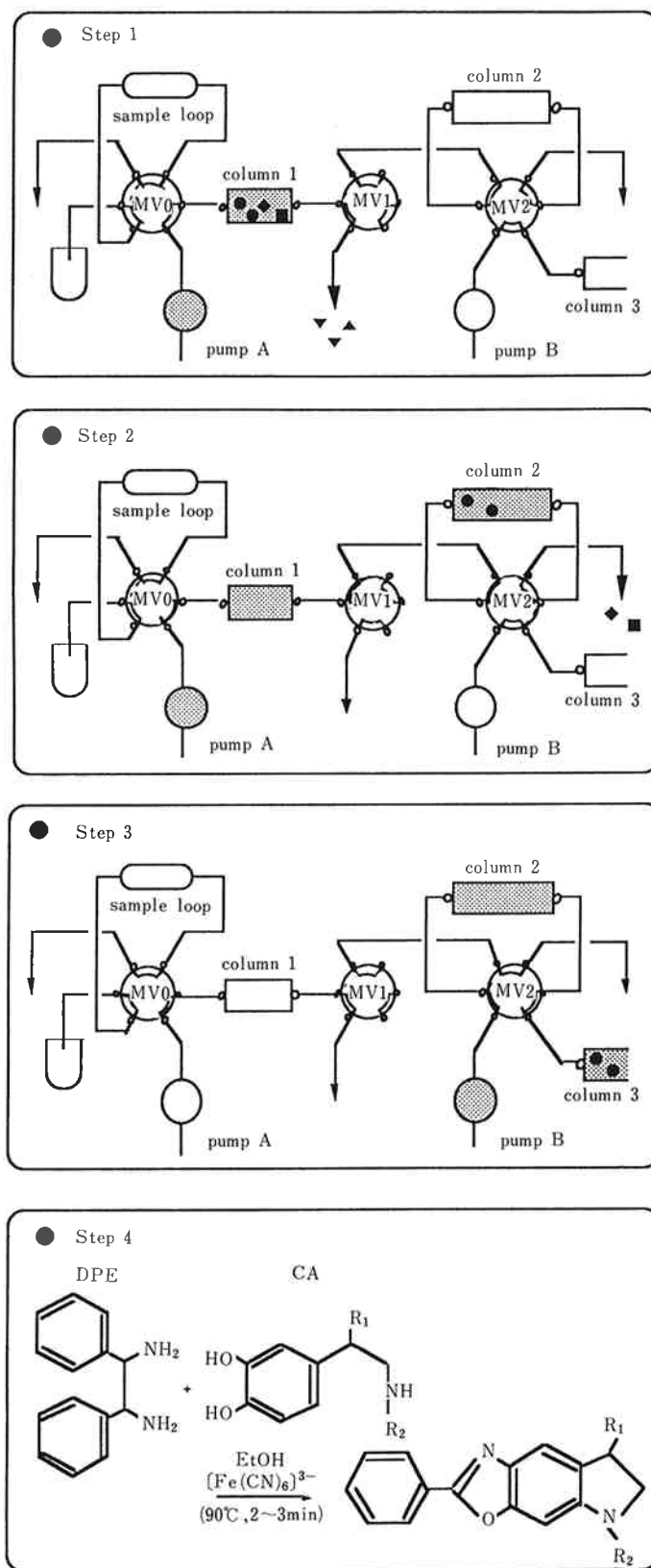


Fig. 2 Schematic diagram of the column-switching system of HLC-725CA

Fig. 3に3つの血漿検体について、従来方法と改良した方法と両方で測定したクロマトパターンを示した。サンプル1は、従来方法でも測定可能な検体である。サンプル2、3は従来方法で測定不可能な検体である。Fig. 3のパターンD、Fのように測定不可能な場合には、NE、DAの位置が大きく乱れることが多く確認される。改良した測定方法では、これらサンプル2、3においても良好に測定出来ることが確認された(Fig. 3-C、E)。幾つかのユーザーより、サンプル2、3のように従来方法で測定不可能な検体を40検体集め、改良した方法で測定を行ったところ38検体については測定が可能となった(Data not shown)。従来方法において、全体の血漿検体の3%程度が測定不可能であるので、この改良した方法を用いることにより測定不可能な検体は全体の0.15%程度になると推定される。

改良した測定方法について同時再現性試験を行った(Table 1)。NE、E、DAいずれにおいても、そのC.V.値は3%以下となり、良好であった。

また、従来方法で測定可能な39検体について改良した測定方法との相関を確認した(Fig. 4)。NE、E、DAいずれにおいても、相関は良好であった。

## 5. 考 察

改良した測定方法を用いることにより、これまで測定が不可能であった血漿検体の90%以上について測定が可能になることが確認された。このことから、改良した測定方法では、測定不可能な検体は全体の0.15%程度になり、ほとんどの血漿検体について測定が可能になることがわかった。同時再現性、従来方法との相関も良好であり、この改良した方法は優れた測定方法であることが確認出来た。この改良した方法については、若干の変更を加え、1検体当たりの分析時間を35分から25分に短縮し、商品化した。現在、「精密分析モード」という品名で販売をしている。

Table 1 Reproducibility of 10 consecutive catecholamine measurements in plasma sample by the improved method

	N	Mean (ng/ml)	S.D. (ng/ml)	C.V. (%)
Epinephrine	10	0.207	0.006	2.7
Norepinephrine	10	0.777	0.022	2.9
Dopamine	10	0.167	0.003	2.2

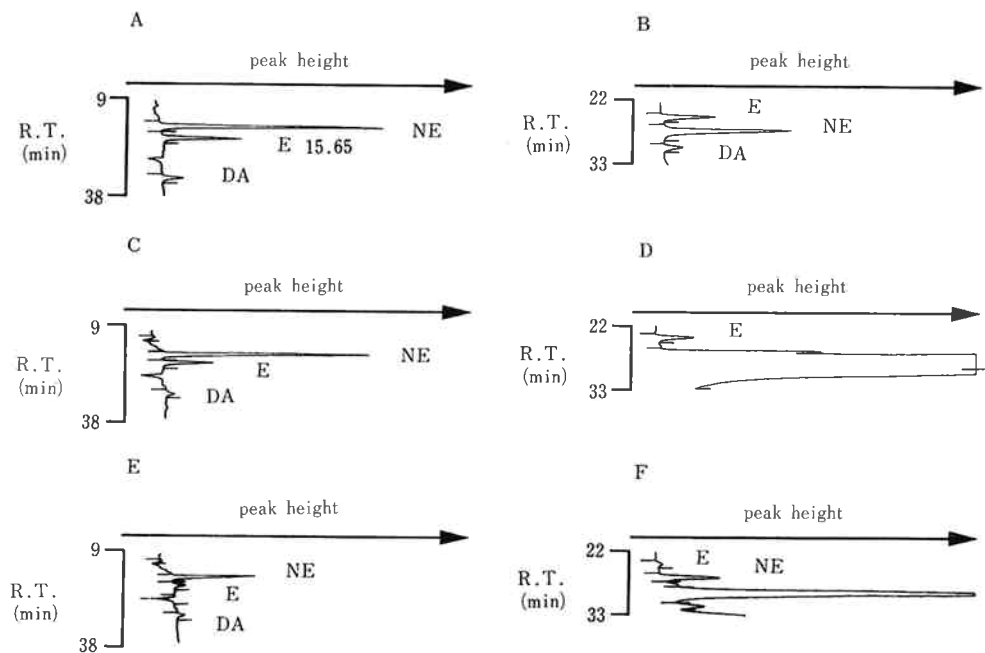


Fig. 3 Chromatograms of plasma samples

Sample 1; A and B, sample 2; C and D, sample 3; E and F. A, C and E, and B, D, and F are analyzed patterns by the improved method, and the normal method, respectively. R.T.; retention time.

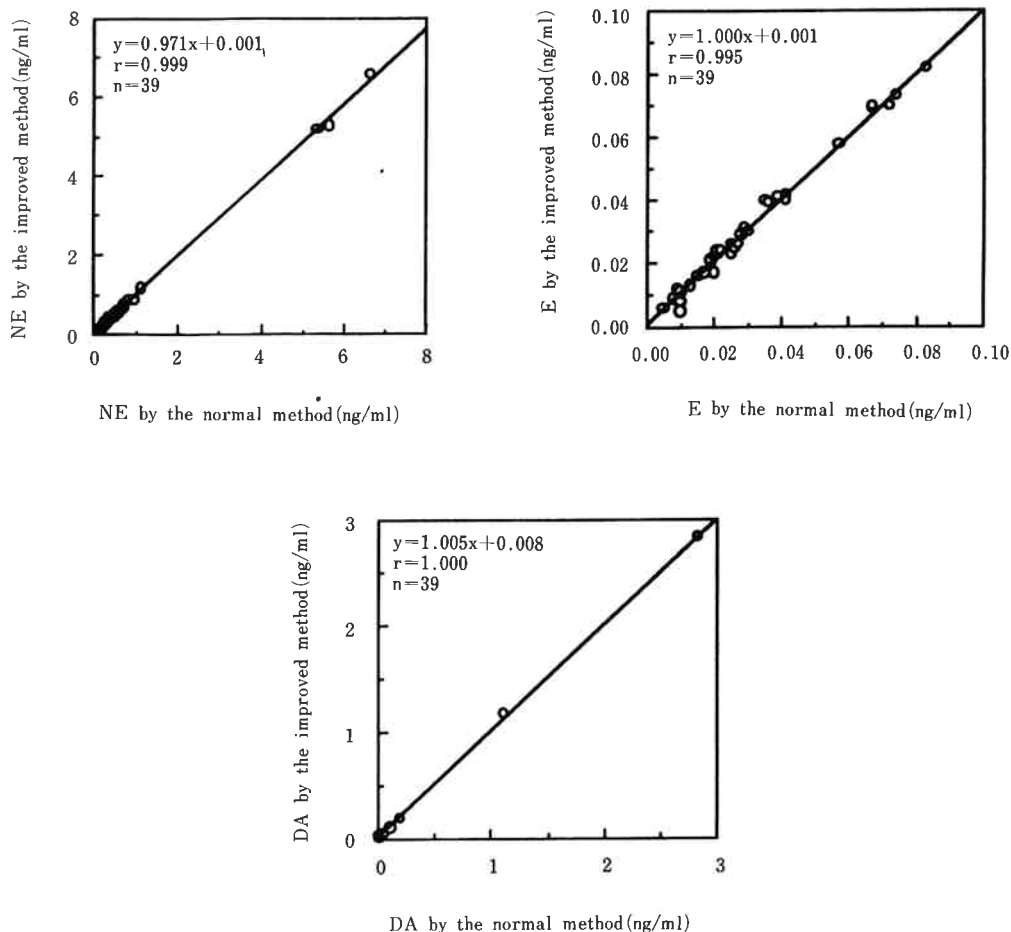


Fig. 4 Correlation of catecholamine concentrations measured by the normal method and the improved method for 39 plasma samples

E ; epinephrine  
NE ; norepinephrine  
DA ; dopamine

以上のように、血漿検体については測定が不可能となる問題について解決した。しかしながら、加水分解尿検体について、この改良した測定方法を用いても数%程度の割合で測定が不可能な検体が見られることが確認されている。加水分解尿検体についても、その原因は患者に投与された薬物によると考えられている。今後、さらなる改良を加え加水分解尿検体についても、測定が不可能な検体がないような測定方法にしたいと考える。

#### 参考文献

- 1) H. Nohta, A. Mitsui and Y. Ohkura ; Spectrofluorimetric determination of catecholamines with 1,2-diphenylethylenediamine. *Anal. Chim. Acta*, **165**, 171-176, (1984).
- 2) A. Mitsui, H. Nohta and Y. Ohkura ; High-performance liquid chromatography of plasma catecholamines using 1,2-diphenylethylenediamine as precolumn fluorescence derivatization reagent. *J. Chromatogr.*, **344**, 61-70, (1985).
- 3) 中井利昭、山田律爾 ; 蛍光スペクトル差を利用したカテコールアミン分別定量キットについての基礎的検討、*臨床検査*, **25**, 1174-1176, (1981).
- 4) 中井利昭 ; カテコールアミン、*臨床検査 (増刊号)*, **38**, 146-147 (1994).
- 5) M. Yoshimura, T. Komori, T. Nakanishi and H. Takahashi ; Estimation of sulphoconjugated catecholamine concentrations in plasma by high-performance liquid chromatography.,

- Ann. Clin. Biochem., 30, 135-141 (1993).  
 6) 辻潮、中西豊文、中井一吉、塩見寿太郎、船橋修之；全自動カテコールアミン分析計 (HLC-8030) による血中、尿中カテコールアミン分画測定、臨床検査機器・試薬、11, 635-141, (1988).

- 7) H. Nohhta, M.-K. Lee and Y. Ohkura ; Fluorescent products of the reaction for the determination of catecholamines with 1,2-diphenylethylenediamine., Anal. Chim. Acta, 267, 137-139, (1992).



著者  
 氏名 広渡 祐史  
 Yuji HIROWATARI  
 入社 昭和61年4月1日  
 所属 科学計測事業部  
 営業部  
 学術課



著者  
 氏名 坪井 基宏  
 Motohiro TUBOI  
 入社 昭和52年4月16日  
 所属 科学計測事業部  
 ゲル製造部



著者  
 氏名 富樫 理美  
 Masami TOGASHI  
 入社 平成元年3月16日  
 所属 科学計測事業部  
 営業部  
 学術課