

ヒト尿中のモノアミン酸性代謝物質の HPLC- 8 チャンネル電気化学検出器による測定

High-performance Liquid Chromatographic Determination of Monoamine Acidic Metabolites
in Human Urine Using an Eight Channel Electrode Electrochemical Detector

真 重 文 子*・篠 塚 則 子**・高 井 信 治***・大久保 昭 行*
Fumiko MASHIGE, Noriko SHINOZUKA, Nobuharu TAKAI and Akiyuki OHKUBO

1. 緒 言

ヒト体液中のカテコールアミン, セロトニンなどのモノアミンやその代謝物質の濃度は, 神経精神関連の疾病を診断するうえできわめて重要な情報である. これらの物質の分析方法は HPLC (高速液体クロマトグラフィー) の適用により顕著な進歩を遂げ¹⁾, 今日では電気化学検出器 (ECD) との組み合わせで広く用いられている²⁾⁻⁶⁾. しかし, 一つまたは二つの ECD により多数の化合物を同時に分析するのは困難で, 抽出などの前処理を必要とする. Matson 等⁷⁾ は多チャンネル ECD とグラジエント溶出 HPLC による検出システムを構築し, 多数のモノアミンおよび関連物質が一斉分析できるようになった. 我々はポーラスカーボンを用いた 4 電極方式のクーロメトリーによる検出器を独自に開発し⁸⁾, これを用いて髄液中の神経伝達物質の同時分析法を確立した⁹⁾. この方法により, 尿中のカテコールアミンやセロトニンはほぼ測定できたが, バニルマンデル酸 (VMA) は非可逆的に酸化されるため定量できなかった. 尿によっては, VMA と 3,4 ジヒドロキシマンデル酸 (DOMA) が妨害ピークにより分離出来ないときもあった.

本稿では尿中のモノアミン代謝物質の HPLC による一斉定量法について述べる. 4 チャンネル ECD を 2 個つなげた 8 チャンネル ECD により酸化電流を測定し, カラムには C₁₈-アニオン交換のミックスモード充てん剤を用いた¹⁰⁾. なお, このカラムによる測定において, ヒト尿中のバニララクティックアシッド (VLA) の定量に用いたピークには他の物質も一緒に溶出していることが明らかになったので, VLA の定量は行わないことにした.

*東京大学医学部

**東京大学生産技術研究所 第 4 部

***東京医科大学 (元東京大学生産技術研究所 第 4 部助教授)

2. 実 験

2.1. 装置

HPLC システム (図 1) はポンプ (LC-6A, 島津), ガードフィルター (Sumipax フィルター PG-ODS, 住化分析センター), ミックスモードカラム (C₁₈/アニオン交換, 150x4.6mm I.D., Alltech.), カラムオープン (CTO-6A, 島津), 2 個のマルチ ECD (三菱化学), パーソナルコンピュータ (NEC PC9801-DS) により構成される. マルチ ECD はポーラスカーボン (直径 3mm 厚さ 3mm) の作用電極, Ag/AgCl 参照電極, ステンレスの対極により構成される⁸⁾.

2.2. 試薬

3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA), ドーパミン (DA), エピネフィリン (E), ノルエピネフィリン (NE), 3,4 ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC), 3-メトキシチラミン (3-MT), ホモバニリン酸 (HVA), VMA, バリニン酸 (VA), VLA, 4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニルエチレングリコール (MHPG), 5-ヒドロキシトリプトファン (5-HTP), 5-ヒドロキシトリプトタミン (5-HT) は Sigma 社製の試薬を用いた. DOMA, 3,4-ジヒドロキシフェニルエチレングリコール (DOPEG), 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA), メタネフリン (MN), ノルメタネフリン (NMN), 3,4-ジヒドロキシヒドロ桂皮酸は Aldrich 社製を用いた. その他の試薬は和光純薬製の HPLC 用を用いた.

2.3. 標準溶液

標準溶液として, 1g/l の DOMA, VMA, DOPAC, VLA, HVA, 5-HIAA, VA および 3,4-ジヒドロキシヒドロ桂皮酸 (内部標準, I.S.) の 0.1N 過塩素酸溶液を

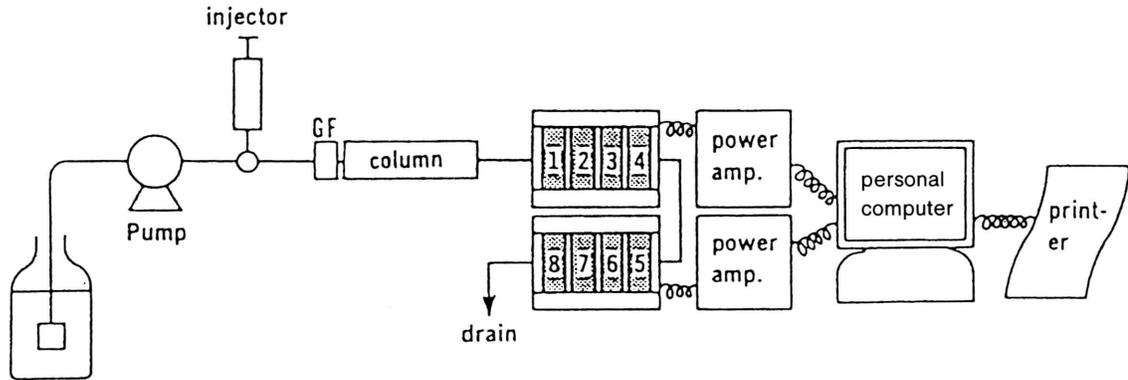


図1 HPLCシステム
(GF: ガードフィルター, 1~8: ECDの電極)

調製し -80°C で保存した。これらの溶液は使用直前に解凍し、溶離液でそれぞれを 0.1mg/l 含むように希釈した。HPLCには $100\mu\text{l}$ を注入した。

2.4. 移動相

50mmol/l のクエン酸、クエン酸三ナトリウム緩衝液($\text{pH}4.0$)の 850ml とメタノール 150ml を混合して調製した。

2.5. 試料

試料の尿は健康な人および患者より集め -80°C に保存した。測定の前に解凍し室温で 1600g で10分間遠心分離した。 $50\mu\text{l}$ の上澄み液、 $\text{I.S. } 50\mu\text{l}$ 、 $900\mu\text{l}$ の移動相を混合しその $100\mu\text{l}$ をHPLCに注入した。

2.6. HPLCの条件

標準溶液および尿の分析には図1のシステムを用いた。試料量は $100\mu\text{l}$ 、流速 0.7ml/min 、カラム温度は 35°C に保った。8チャンネルの電極の電位は、 $200, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600\text{mV}$ にこの順に設定した。各化合物の濃度は内部標準に対するピーク比より求めた。定量に用いたチャンネルは次の通りである: DOMA (1), VMA (4), DOPAC (1), VLA (5), HVA (5), 5-HIAA (2), VA (7), I.S. (1)。

2.7. 他の方法による分析

尿中のクレアチニンは日立736自動分析装置を用い、Jaffe反応により定量した¹¹⁾。VMAとHVAはHLC-726 VMA(東ソー)により¹²⁾、5-HIAAはHPLC-ECD¹³⁾により定量した。

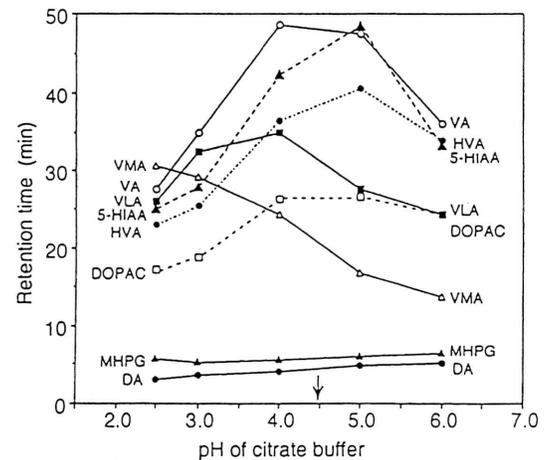


図2 保持時間に及ぼす pH の影響

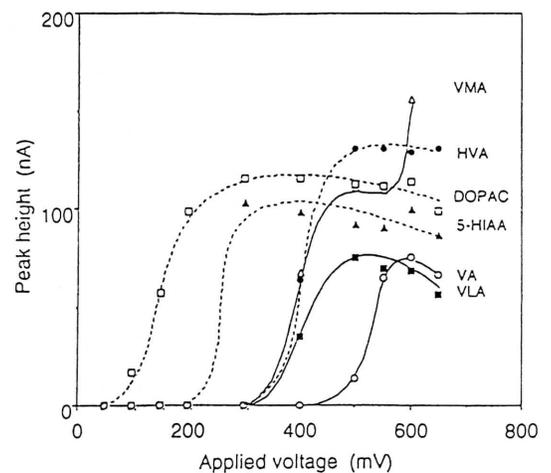


図3 ボルタングラム

研究速報

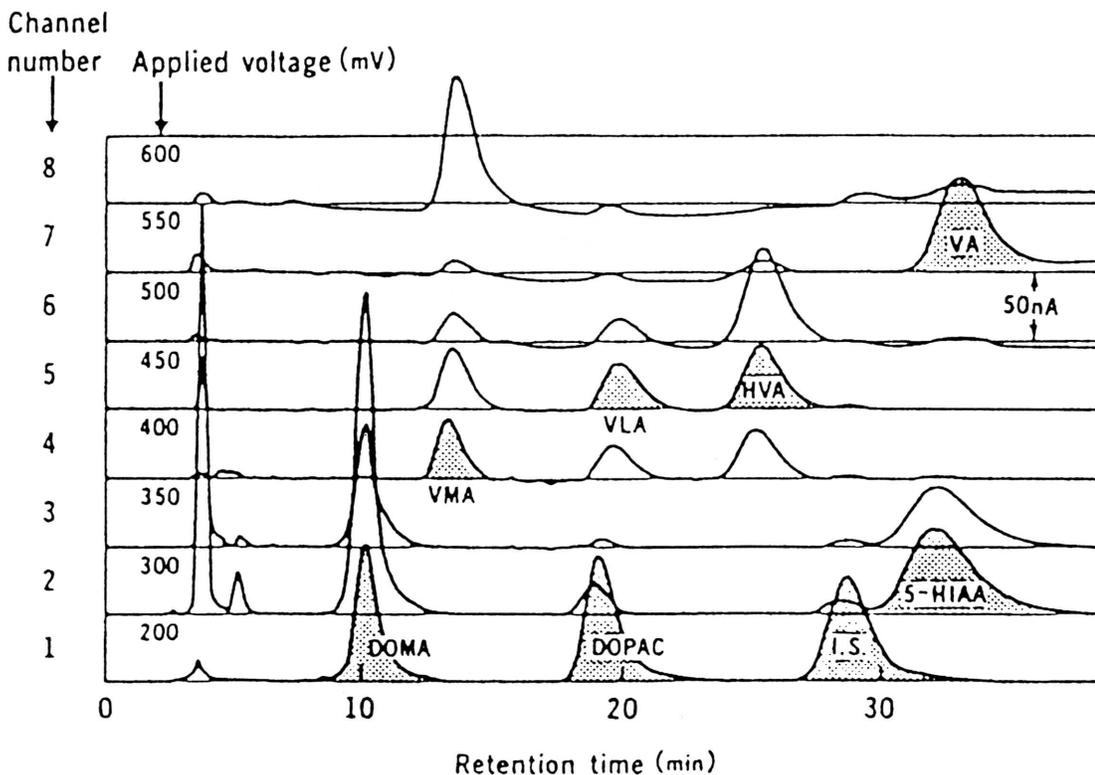


図4 標準試料のクロマトグラム
(影を付けたピークを定量に使用 注入量:各10ng)

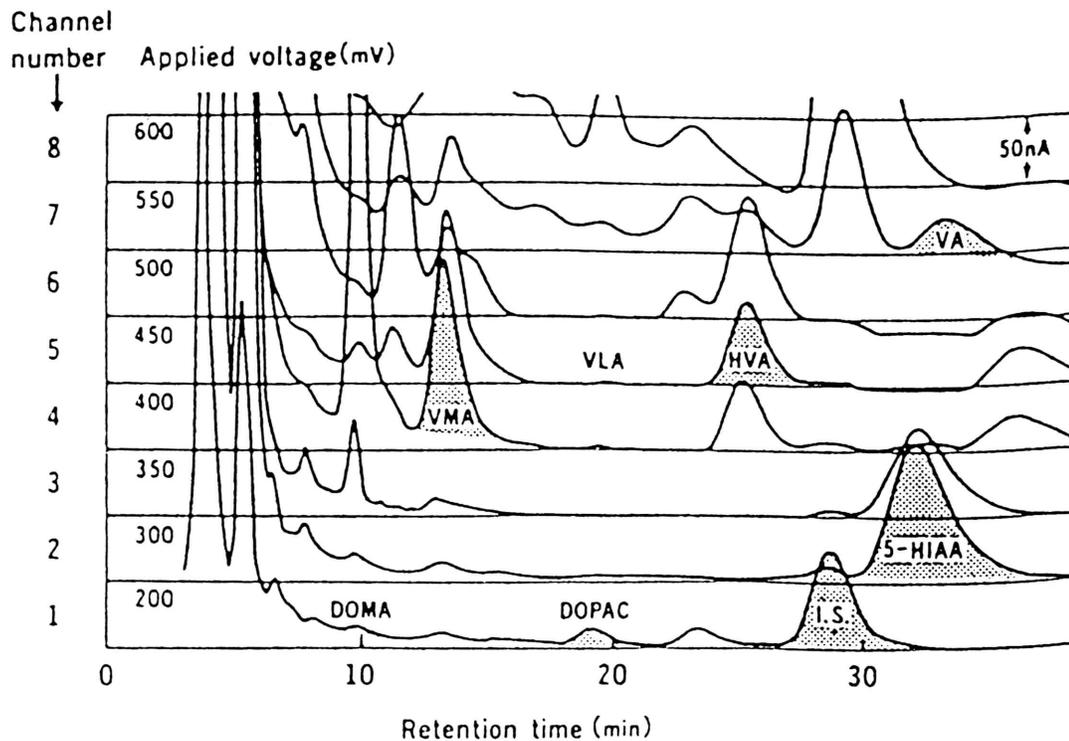


図5 ヒト尿のクロマトグラム

3. 結果と考察

3.1. クロマトグラフィー

各化合物の保持時間と pH との関係を図 2 に示す。最適 pH は 4.5 であった。分析時間を短縮するためにメタノールを加えた。図 3 にポルトグラムを示す。これより 8 チャンネルの電位を 2.6. HPLC の条件のように設定した。

標準溶液のクロマトグラムを図 4 に示した。全ての対象化合物は 35 分で分離した。カテコールアミン類, DOPA, NMN, MN, DOPEG, MHPG, 5-HT, 5-HTP, 3-MT は 5 分以内に溶出し, 分離しなかった。ヒト尿のクロマトグラムを図 5 に示す。チャンネル 1 における DOMA のピークは小さく, チャンネル 3-5 では妨害ピークが現われるので, 以後の実験では DOMA の測定は出来なかった。

3.2. 測定の精度

検出限界 (S/N=3) は, 標準溶液で, VMA : 240, DOPAC : 100, VLA : 350, HVA : 170, 5-HIAA : 250, VA : 90 (pg/100 μ l) であった。尿中の値は, VMA : 0.05, DOPAC : 0.02, VLA : 0.07, HVA : 0.03, 5-HIAA : 0.05, VA : 0.02 (mg/l) であった。

標準溶液中のいずれの化合物も 0.25-50ng の範囲で検量線は原点を通る直線となった。患者尿の定量における日内変動およびコントロール尿における日差変動を表 1 に示した。

表 1 再現性

Compound	Inter-assay (n=5)		Intra-assay (n=5)	
	mean(mg/l)	C.V.(%)	mean(mg/l)	C.V.(%)
VMA	5.65	4.7	5.42	1.8
DOPAC	3.13	3.7	0.29	3.4
HVA	6.71	2.0	3.23	0.7
5-HIAA	4.95	4.2	4.31	0.9
VA	2.28	5.2	0.87	3.9

VMA, HVA, 5-HIAA の本法と他の方法による測定値は良く一致した。

3.3. 健常値

健常者の尿試料は, 前日の午後 1 時以後バナナ, コーヒー, バニラ含有食品を摂取しない人の早朝尿を 20 人

(男性 10, 女性 10, 平均年齢 33.2 \pm 11.8) から採取した。各物質の排出量は mg/g クレアチニンで表した。平均値 \pm 2S.D. の値は, VMA : 0.61~4.36, DOPAC : 0.13~1.02, HVA : 0.67~6.55, 5-HIAA : 0.50~5.14, VA : 0~0.55 (mg/g クレアチニン) であった。

4. 結 語

神経精神疾患の診断において尿中のカテコールアミン代謝物質および 5-HIAA の濃度レベルを知ることは非常に重要である。これらの化合物はミックスタイプのカラムを用い, HPLC-ECD により一斉分析できることが明らかになった。本法はアイソクラティック溶出を用いており, 簡便性, スピード, 再現性, 信頼度においてグラジエント溶出より優れている。本法をもちいて年齢別の健常値を測定中である。
(1994年12月22日受理)

参 考 文 献

- 1) B. Kägedal and D.S.Goldstein, J.Chromatogr., 429 (1988) 177.
- 2) A.M. Krstulovic, M. zakaria, K. Lohse and L. Bertani-Dziedzic, J. Chromatogr., 186 (1979) 733.
- 3) C.G. Honegger, W. Kreinger, H. Langemann and A. Kempf, J. Chromatogr., 381 (1986) 249.
- 4) P. Wester, J. Gottfries, K. Johansson, F. Klinteback and B. Winblad, J. Chromatogr., 415 (1987) 261.
- 5) E. Koyama, A. Minegishi and T. Isizaki, Clin. Chem., 34 (1988) 680.
- 6) P.H. Gamache, M.L. Kingery and I.N. Acworth, Clin. Chem., 39 (1993) 1825.
- 7) W.R. Matson, P. Langlais, L. Voicer, P.H. Gamache, E. Bird and K.A. Mark, Clin. Chem., 30 (1984) 1477.
- 8) N. Takai, N. Shinozuka, F. Masige, A. Ohkubo, N. Nukina, S. Iijima, Y. Fukui, I. Sakuma, in K. Miyai, T. Kanno and E. Ishikawa (Editors), Progress in Clinical Biochemistry, Elsevier, Amsterdam, 1992, p. 157.
- 9) 真重文子, 高井信治, 篠塚則子, 松島美一, 大久保昭行ほか, 臨床化学, 22 (1993) 147.
- 10) F. Mashige, A. Ohkubo, N. Shinozuka, N. Takai, et al, J.Chromatogr. B, 658 (1994) 63.
- 11) K. Larsen, Clin. Chem. Acta, 27 (1979) 158.
- 12) S. Kawaguchi, N. Hirachi and M. Fukamachi, J. Chromatogr., 567 (1991) 231.
- 13) D.F. Davidson and J. Williamson, Clin. Chem., 34 (1988) 768.