

蛍光検出高速液体クロマトグラフィーによる血しょう及び尿中イソプロテレノールの高感度定量

能田 均, 山口悦子, 三井あかね, 大坪健司, 大倉洋甫^{®*}

(1985 年 9 月 26 日受理)

交感神経作動薬のイソプロテレノール(IP)の蛍光検出高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による定量法を開発した。血しょう及び尿中 IP 及び内標準物質の *N*-メチルドーパミンは陽イオン交換樹脂を充てんしたカートリッジにより前処理し、カテコール化合物に特異的な蛍光試薬 1,2-ジフェニルエチレンジアミンにより蛍光誘導体化して HPLC・蛍光検出する。蛍光誘導体は逆相分配カラムを用いてメタノール及びトリス塩酸緩衝液(pH 7.0)の混液を溶離液として8分以内に良好に分離される。IPの検出限界($S/N=2$)は15 fmol/50 μ l 注入量であった。IP は経口投与した場合、速やかに IP サルフェートとなるので、総 IP (遊離及び IP サルフェートの総和)の定量条件についても検討した。この方法を遊離及び総 IP の血中及び尿中モニターに適用した。

1 緒 言

イソプロテレノール(IP, *N*-イソプロピルノルエピネフリン)はエピネフリン(E)と同様に交感神経刺激作用を有しており、臨床的には心臓興奮薬及び抗ぜん息薬として用いられている。IP の測定法としては蛍光法¹⁾²⁾、ガスクロマトグラフィー・炎光光度検出法³⁾、蛍光検出⁴⁾又は電気化学検出⁵⁾による高速液体クロマトグラフィー(HPLC)及びラジオアイソトープ法⁶⁾⁷⁾が報告されている。これらの中で HPLC による方法は比較的容易に高感度かつ高選択性が得られる。しかし HPLC・蛍光検出法ではトリヒドロキシインドール反応をポストカラム誘導体化反応に利用するため複雑な反応装置を必要とする。又 HPLC・電気化学検出法は試料中に共存する妨害物質を除去するために複雑な前処理を必要とし、血しょう中遊離 IP は測定できず、又高精度を得るためには操作を注意深く行う必要がある。

著者らは 1,2-ジフェニルエチレンジアミン(メソ体, DPE)が酸化剤[ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム]の存在下緩やかな条件(pH 6~7, 0~50°C)でカテコール化合物と反応し強い蛍光を与えることを見いだした⁸⁾。この反応はカテコールアミン[CA: E, ノルエピネフリン(NE), ドーパミン(DA)]のプレラベル化反応として有用であり、尿及び血中 CA の定量に応用した⁹⁾¹⁰⁾。本研究においては、この反応を IP のプレラベル化に適用

し、内標準物質に *N*-メチルドーパミン(NMDA)を用いる血しょう及び尿中 IP の定量法を確立した。IP は経口投与した場合、速やかに硫酸抱合体となるので¹⁾、IP サルフェートの加水分解条件についても検討し、血しょう及び尿中の総 IP (遊離 IP と IP サルフェートの加水分解により生じた IP の総和)の定量法を検討した。更にこの方法がヒトに経口投与した IP の血中及び尿中モニターに適用できるか否かを調べた。

2 実 験

2.1 試薬・溶液

IP 塩酸塩及び NMDA 塩酸塩はそれぞれ半井化学製及び Sigma 製を用いた。DPE は同仁化学製を用いた。その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

DPE 溶液(0.1 M, pH 6.7): DPE 212mg を 0.1 M 塩酸 10 ml に溶解して用いた。4°C で少なくとも 1 か月は安定。

リン酸リチウム緩衝液(0.2 M, pH 5.8): 0.2 M リン酸と 0.25 M 水酸化リチウムを含む 0.2 M リン酸を混合して pH 5.8 となるように調製した。

トヨバック SP (強酸性陽イオン交換樹脂, Na⁺, 粒子径 19~40 μ m; 東洋曹達製)カートリッジ: 20%(v/v) トヨバック SP 懸濁液(水) 0.5 ml をポリエチレンチューブ(35×6 mm i.d.)に注いで作製(樹脂量 0.1 ml)。カートリッジ上部はディスポーザブルなプラスチックシリンジ(テルモ製)を接続することにより、溶媒や溶液をカートリッジに通すことができる。カートリッジは使用前に 2.0 M 水酸化リチウム(1 ml × 2), 水(10 ml), 12 M 塩酸-エタノール(1:9, v/v)(1 ml × 2)及び水(10 ml)で順次洗浄し、更に 0.2 M リン酸リチウム緩

* 九州大学薬学部: 812 福岡県福岡市東区馬出3-1-1

衝液 (pH 5.8) (1 ml × 3) を通し平衡化しておく。

血しょう: ヘパリン処理した全血 (2 ml) に還元型グルタチオン 5mg を加えて混和した後 4°C で約 1000 g, 10 分間遠心分離して得た。血しょうは使用に供するまで -70°C で凍結保存した。

24 時間尿: 6 M 塩酸 10 ml の存在下採取した。使用まで 4°C で保存。

2.2 装置及び HPLC 条件

HPLC 用ポンプ: 日立 635A 型液体クロマトグラフ。

試料注入装置: Rheodyne 7125 syringe-loading 試料注入バルブ。

蛍光検出: 日立 650-10S 型分光蛍光光度計 (励起側 370nm, 発光側 475nm, スリット幅はいずれも 10nm)。

カラム: TSK-gel ODS 120T (粒子径 5 µm, 150 × 4.6 mm i.d., 東洋曹達)。

移動相: メタノール-50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) (4:1, v/v)。

流速: 1.0 ml/min。

カラム温度: 室温 (23~27°C)。

IP サルフェートの加水分解時の加熱は Pierce 製リアクティサーモを使用。

2.3 試料の前処理

血しょう及び尿中遊離 IP: 血しょう 200 µl 又は尿 100 µl に NMDA (それぞれ 0.02 及び 1.0 nmol/ml) 50 µl 及び 0.2 M リン酸リチウム緩衝液 (pH 5.8) 0.5 ml を加える。この混液をトヨパック SP カートリッジに注ぐ。水 10 ml 及び水-アセトニトリル (1:1, v/v) 2 ml で洗浄した後、吸着したアミンを 0.6 M 塩化カリウム-アセトニトリル {1:1, v/v; 0.6 mM ヘキサシアノ鉄(III) 酸カリウムを含む} で溶出する。

血しょう総 IP: 血しょう 50 µl に NMDA (1 nmol/ml) 20 µl, 水 150 µl 及び 1 M 過塩素酸 200 µl を加え、約 1000 g で 5 分間遠心して除タンパクする。上澄み 300 µl を 100°C で 20 分間加熱して IP サルフェートを加水分解する。冷後ジチオスレイトール 5 mg 及び上記緩衝液 400 µl を加えた後、0.5 M 炭酸カリウム 100 µl により pH 5.8~6.2 に調整する。遠心後上澄み 600 µl を上記カートリッジに注ぎ、遊離 IP の場合と同様に洗浄及び溶出を行う。

尿中総 IP: 尿 100 µl に NMDA (10 nmol/ml) 100 µl 及び 0.5 M 過塩素酸 200 µl を加えて 100°C で 20 分間加熱する。この 20 µl と上記緩衝液 600 µl を上記カートリッジに注ぎ、以後遊離 IP の場合と同様に操作する。

2.4 蛍光誘導体化

溶出液に DPE 溶液 50 µl を加え、37°C で 40 分間

放置する。反応液 50 µl を HPLC に付す。IP は内標準法により定量する。

3 結果及び考察

3.1 HPLC 条件

IP 及び NMDA の標準溶液を 2.4 の操作法に従い蛍光誘導体化して得たクロマトグラムを Fig. 1(a) に示す。IP 及び NMDA の誘導体は 8 分以内に完全に分離されている。DPE 自身は無蛍光性であり、試薬から試験液においてはピークは全く観測されない。IP 及び NMDA の誘導体の保持時間及び移動相中における蛍光励起及び蛍光発光極大波長を Table 1 に示す。蛍光検出は励起及び発光側いずれも IP の極大波長を用いた。

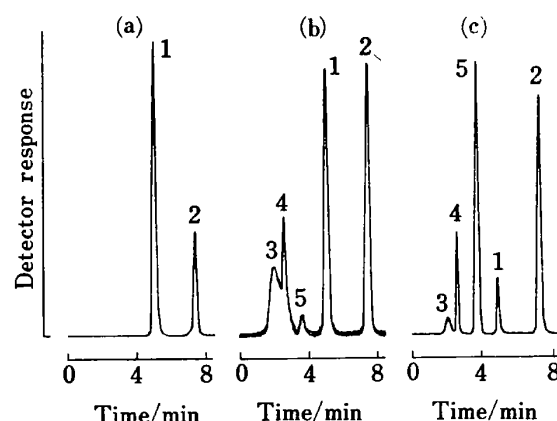


Fig. 1 Chromatograms obtained with (a) standard mixture of isoproterenol (IP) and *N*-methyltyldopamine (NMDA) (10 pmol/ml each), and (b) plasma at 15 min and (c) 24-h urine after dose of 0.1 mg/kg IP

Peaks: 1 IP; 2 NMDA; 3 unidentified; 4 NE; 5 E and DA; IP concentration (pmol/ml): plasma 1.8; urine 42.4; Detector sensitivity: a 3; b 13; c 0.3

CA の定量⁽⁹⁾においては移動相としてアセトニトリル-メタノール-50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) (5:1:4, v/v) が用いられている。この溶離液を用いても IP 及び NMDA は十分に分離され ($\alpha=1.8$), 又血中及び尿中においては混在が予想される CA とも分離されるが, NMDA の溶出に比較的長時間 (12.2 分) を要する。今回設定したメタノール及び上記緩衝液の混液を用いた場合, IP 及び NMDA は 8 分以内に良好に分離され, 又これらのピークは CA によるピークとも良好に分離される。トリス塩酸緩衝液の pH 及び塩濃度はそれぞれ 6.0~7.5 及び 10~1000 mM の間で分離及びピーク高さに影響を与えなかった。この緩衝液の代わりに水を用いた場合にはピーク高さの減少とともにピ

Table 1 Retention times, fluorescence excitation and emission maxima and relative peak heights of 1,2-diphenylethylenediamine (DPE) derivatives of catechol compounds

Compound	Retention time/min	Excitation maximum/nm	Emission maximum/nm	Relative peak height†
IP	5.0	370	475	100
NMDA	7.4	360	490	37
NE	2.6	355	465	19
E	3.7	360	475	48
DA	3.8	350	475	29
DOPEG	2.3	345	460	16
DOPAC	5.2	350	450	8
α -Methyldopa	3.8	355	490	5
Catechol	2.8	340	455	1

Portions (0.3 ml) of 1 nmol/ml catechol compounds dissolved in the eluent for the clean-up procedure with Toyopak SP cartridge were treated according to the procedure for the derivatization followed by the HPLC. † The peak height of DPE derivative from IP was taken as 100.

ークの広がり観測された。

3.2 蛍光誘導体化

蛍光誘導体化の反応条件は CA の定量法¹⁰⁾に従った。

CA, IP 及び NMDA を含む種々の カテコール化合物を本反応により 蛍光誘導体化し, HPLC に付して得られるピークの保持時間, 相対ピーク高さ及び蛍光励起及び蛍光発光極大波長を Table 1 に示す。極大波長については励起及び発光ともに化合物間で大きな差はみられない。反応液中の IP 及び NMDA の蛍光誘導体は室温, 室内光のもとで少なくとも 8 時間は安定であった。

3.3 遊離 IP の定量

血中に存在するタンパク質や還元性物質は DPE 反応を妨害する。又血中及び尿中には CA のほかにその代謝物である 3,4-ジヒドロキシフェニルエチレンジリコール (DOPEG), 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC) などのカテコール化合物も存在し¹¹⁾, これらも DPE により発蛍光するので (Table 1), 高濃度に存在すると IP と NMDA のピークに影響を与える可能性がある。そこで前処理法としてトヨパック SP カートリッジ, 弱酸性陽イオン交換樹脂 CM-トヨパール (カルボキシメチル樹脂, 東洋曹達製) カートリッジ及び酸処理アルミナ¹²⁾による前処理を検討した。いずれの場合も IP の定量は可能であるが, 安定して高い回収率が得られ, 操作も簡単なトヨパック SP カートリッジを

採用した。健常人血しょうに添加した IP 及び NMDA (いずれも 2 pmol) の回収率はそれぞれ 87.9 ± 1.7 及び $92.3 \pm 1.4\%$ (平均±標準偏差, $n=5$) であった。

IP 塩酸塩 (0.1 mg/kg) を経口投与後 15 分の血しょう及び投与後の 24 時間尿を操作法に従い処理して得たクロマトグラムを Fig. 1(b) 及び (c) に示す。IP のピークの確認は保持時間, 溶出液の蛍光スペクトル及び標品との共クロマトグラフィーにより行った。又 IP 投与前の血しょうにおいては IP 及び NMDA の溶出位置にピークは観測されなかった。Fig. 1 のすべてのピークは, 誘導体化反応において DPE 溶液又はヘキサシアノ鉄(III) 酸カリウム溶液を除いた場合には消失する。これよりピーク 3~5 はカテコール化合物に由来していることが分かる。ピーク 4 及び 5 はそれぞれ NE 及び E+DA に由来することを CA 定量法¹⁰⁾の HPLC 条件で分離を行い確認した。

3.4 総 IP の定量

ヒトでは経口投与した IP はその大部分 (90% 以上) が速やかに硫酸抱合体となる⁷⁾。IP サルフェートは過塩素酸により加水分解を行い, 遊離型とした後蛍光誘導体化した。加水分解条件の検討においては IP サルフェートの標品が得られないため, IP 投与後の血しょう及び尿中に含まれている IP サルフェートを対象に行った。加水分解時の加熱は血しょう及び尿いずれの場合も 100°C において 15~25 分間で最大かつ一定の遊離 IP が生成した。これ以上の加熱時間ではわずかに減少するが, これは生成した遊離 IP が分解しているものと考えられる。90°C ではこのような分解はみられないが反応の完結に約 50 分を要した。従って 100°C で 20 分間加熱して加水分解を行うことにした。過塩素酸の濃度は尿試料については 0.4~0.8 M で最大の遊離 IP 生成量を与えている。ここでは過塩素酸濃度を 0.5 M に設定した (反応液中 0.25 M に相当)。血しょうは過塩素酸を加えることにより除タンパクを行い, その上澄みに存在する過塩素酸により IP サルフェートを加水分解することにした。過塩素酸の濃度は 0.5 M 以上で最大の遊離 IP 生成量を与える。ここでは過塩素酸濃度を 1.0 M に設定した。加水分解液は血しょうの場合にはジチオスレイトール及び 0.2 M リン酸リチウム緩衝液 (pH 5.8) を加えた後, 炭酸カリウムにより pH 5.8~6.2 に調整する。これをトヨパック SP カートリッジに注ぎ, 以後遊離 IP 定量の場合と同様に処理する。加水分解液にジチオスレイトールを添加しない場合, カテコール化合物特有のアルカリ性における酸化によると考えられる IP

及び NMDA の分解がみられ, これらアミンのカートリッジからの回収率の低下及び定量の再現性の低下が起こった. 又尿の場合は, 中和しないで上記緩衝液で約 30 倍希釈して上記カートリッジに注ぐ.

Fig. 1 における試料と同一の血しょう及び尿を操作法に従い処理して得たクロマトグラムを Fig. 2 に示す. 血しょう及び尿いずれも Fig. 1 とほぼ同じパターンのクロマトグラムが得られた. 又 IP 投与前の血しょう及び尿においては IP 及び NMDA の溶出時間にはピークはみられなかった. ピークの確認は遊離 IP の定量の場合と同様に行った.

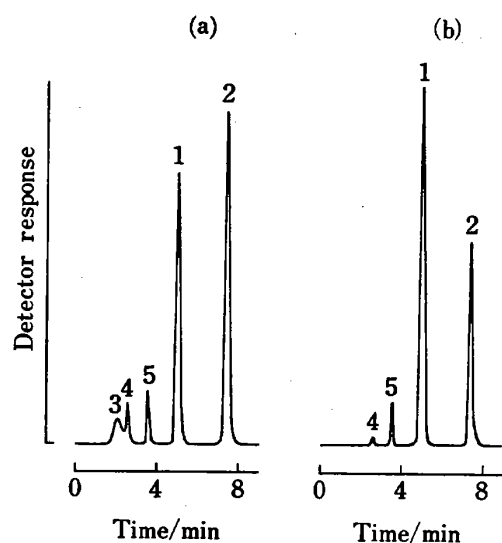


Fig. 2 Chromatograms obtained with hydrolyzed (a) plasma and (b) urine samples used in Fig. 1

Peaks: 1 IP, 2 NMDA, 3 unidentified, 4 NE, 5 E and DA; Total IP concentration: plasma 0.12 nmol/ml, urine 6.7 μ mol/ml; Detector sensitivity: a 1.2, b 0.3

3.5 検量線, 繰り返し精度及び検出限界

IP 投与前の血しょう及び尿試料に IP を添加して検量線を作成した. IP と NMDA のピーク高さの比は IP の添加量 (1~1000 pmol) に比例した.

Fig. 1 及び 2 での試料を用いて血しょう遊離 IP, 血しょう総 IP, 尿中遊離 IP 及び尿中総 IP をそれぞれ 10 回同時定量したときの相対標準偏差はそれぞれ 3.8, 3.4, 2.3 及び 2.4% であった.

本法の $S/N=2$ における検出限界は 15 fmol/50 μ l 注入量であった.

3.6 IP 及び IP サルフェートのモニター

健康人男性 3 名に IP 塩酸塩粉末 (0.1 及び 0.2 mg/

kg) 及び市販の持続錠 (科研薬製; IP 塩酸塩 20 mg を含む; 0.3 mg/kg に相当) を経口投与し, 15 分から 8 時間における血しょう中遊離及び総 IP を本法でモニターした. 又 24 時間尿中の遊離及び総 IP も定量した.

血しょう遊離 IP は粉末 0.1 及び 0.2 mg/kg 投与の場合, 投与後 15 分でそれぞれ 1.9 及び 2.3 pmol/ml 検出されたが, それ以降は検出されなかった. 又持続錠の場合は遊離 IP は全く検出されなかった. 血しょう総 IP は粉末投与の場合 2 時間で最高濃度となるのに対して, 持続錠では 5 時間後に最高濃度に達した (Fig. 3).

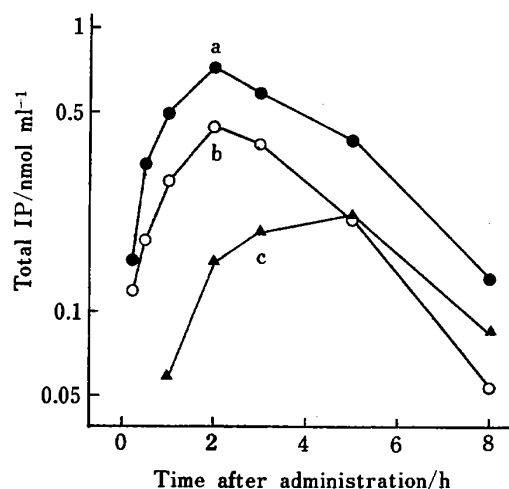


Fig. 3 Plasma concentration of total IP after oral administration of IP in a single dose to healthy men at 9:00 a.m. who had breakfast at ca. 8:00 a.m.

Dose, body weight and age—a: 0.2 mg/kg (powder), 62 kg, 22 year; b: 0.1 mg/kg (powder), 64 kg, 28 year; c: 20 mg (timed-release tablet), 63 kg, 30 year

24 時間尿中には, 粉末 0.1 及び 0.2 mg/kg 及び持続錠投与において遊離 IP はそれぞれ 65.8, 143.6 及び 78.1 nmol, 総 IP はそれぞれ 10.3, 26.6 及び 22.0 μ mol 排出された.

Fig. 3 の各プロットにおける血しょう (19 検体) を用いて, 本法で得た総 IP 値 (x , nmol/ml) と HPLC-電気化学検出法⁵⁾ (ただし検出には柳本 VMD-101 型ポルタンメトリー検出器を使用) により得た値 (y , nmol/ml) との相関を求めたところ, 相関図は良好な直線性 (相関係数 0.998) を示し, 直線回帰式は $y=1.012x+0.003$ であった.

文 献

- 1) Z. Deyl, J. Pilny, J. Rosmus: *J. Chromatogr.*,

- 53, 575 (1970).
- 2) C. D. Morgan, C. R. J. Ruthven, M. Sandler : *Clin. Chim. Acta*, **26**, 381 (1969).
 - 3) J. R. Watson, R. C. Lawrence : *J. Pharm. Sci.*, **66**, 560 (1977).
 - 4) Y. Kishimoto, S. Ohgitani, A. Yamatodani, M. Kuro, F. Okuyama : *J. Chromatogr.*, **231**, 121 (1982).
 - 5) R. C. Causon, R. Desjardins, M. J. Brown, D. S. Davies : *J. Chromatogr.*, **306**, 257 (1984).
 - 6) M. E. Conolly, D. S. Davies, C. T. Dollery, C. D. Morgan, J. W. Paterson, M. Sandler : *Brit. J. Pharmacol.*, **46**, 458 (1972).
 - 7) F. Teixeira, D. Branco, J. E. Torrinha : *Pharmacology*, **18**, 228 (1979).
 - 8) H. Nohta, A. Mitsui, Y. Ohkura : *Anal. Chim. Acta*, **165**, 171 (1984).
 - 9) H. Nohta, A. Mitsui, Y. Ohkura : *Bunseki Kagaku*, **33**, E263 (1984).
 - 10) A. Mitsui, H. Nohta, Y. Ohkura : *J. Chromatogr.*, **344**, 61 (1985).
 - 11) D. F. Sharman : *British Medical Bulletin*, **29**, 110 (1973).
 - 12) A. H. Anton, D. F. Sayre : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **138**, 360 (1962).



Highly sensitive determination of isoproterenol in plasma and urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection.

Hitoshi NOHTA, Etsuko YAMAGUCHI, Akane MITSUI, Kenji OHTSUBO and Yosuke OHKURA (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka 812)

Isoproterenol has been employed as a bronchodilator and a cardiac stimulant. A simple and highly sensitive method for the determination of free isoproterenol and total isoproterenol (the sum of free isoproterenol and its major metabolite, isoproterenol sulfate) in human plasma and urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection has been established. After strong cation-exchange chromatography on a Toyopak SP cartridge, free isoproterenol and *N*-methyldopamine (internal standard) in plasma or urine are converted into the corresponding fluorescent compounds by reaction with 1,2-diphenylethylenediamine in aqueous acetonitrile in the presence of potassium hexacyanoferrate (III). These compounds are separated within 8 min on a reversed phase column, TSK-gel ODS 120T with isocratic elution using a mixture of methanol and 50 mM tris-hydrochloric acid buffer (pH 7.0) (4 : 1, v/v). Isoproterenol sulfate is hydrolyzed by heating with perchloric acid at 100°C for 20 min to isoproterenol. The detection limit for isoproterenol is 15 fmol in a 50-μl injection volume. This method can be applied to monitoring isoproterenol in plasma and urine.

(Received September 26, 1985)

Keyword phrases

isoproterenol in human plasma and urine; free isoproterenol; total isoproterenol; fluorescent derivatization with 1,2-diphenylethylenediamine; high performance liquid chromatography with fluorescence detection.