

# Lund 氏の Trihydroxyindol 法による Adrenaline, Noradrenaline 測定法の検討

昭和35年11月28日 受付

信州大学医学部生化学教室 (主任: 藤村紫郎教授)

桜井 武彦 牧田 豊 市川 さかえ

信州大学医学部丸田外科教室 (主任: 丸田公雄教授)

降旗 力男 中 多 巽

## Critical Studies on the Method for the Determination of Adrenaline and Noradrenaline with Trihydroxyindol by A. Lund

Takehiko Sakurai, Yutaka Makita and Sakae Ichikawa

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Shinshu University

(Director; Prof. S. Fujimura)

Rikio Furihata and Tatsumi Nakata

Department of Surgery, Faculty of Medicine, Shinshu University

(Director; Prof. K. Maruta)

### 緒 言

Catecholamine の化学的定量法は大別して、比色法によるものと蛍光法によるものとに分けられる。比色法によるものは感度が低く体液中の微量の Catecholamine の測定には不適當であり、現在では蛍光法による測定が多く行はれている。

蛍光法をさらに Catecholamine (Trihydroxyindol) 法と Ethylendiamine (EDA) 縮合法に分類される。この何れを使用するかについては多くの問題点がある。即ち測定の対称物である末梢血液及び尿中の Adrenaline, Noradrenaline 量は極めて微量であり、この他にも化学構造上、或いは化学的性状の類似した Catechol 誘導体が混在しており、これらは何れも Adrenaline, Noradrenaline の分類定量に阻害物質となる事が多く、何れの測定法にも特異性及び正確度に関して多少の難点が存している。

Weil-Malherbe & Bone は人の末梢血液中には EDA 法により蛍光を発する Catechol 誘導体は存在しないと報告しているが Valk & Price, Euler 等によると、人の血液中の Adrenaline, Noradrenaline について、EDA 法と THI 法の測定値には差があり、これは 3, 4-Dihydroxyphenylacetic acid (dopac) が血液中に混在し、この為め Ethylendiamine と反応して強い蛍光を発する為めに EDA 法の測定値が THI 法より大となるのであろうとした。この故に Euler

等は EDA 法による Adrenaline, Noradrenaline の測定は dopa が干渉物質となるから特異性が無いとした。これには Weil-Malherbe 等の反論もあり、Seref, Zileli 等は EDA 法と THI 法を比較し、健康者の血漿については一致した測定値が得られるが、腎機能不全の場合は EDA 法で Catecholamine が高値を示す。これは病的な Phenol 誘導体の混在によるものと発表している。又尿中の Catecholamine の測定に関してもその中に混在する dopa, hydroxytyramine (dopamine) 等の影響を受けるものである。

以上に述べた如く、Catecholamine 測定法の特異性については現在多くの論議があり、今後さらに検討されるべき問題である。

ここで著者等が実験した Lund の THI 法による Adrenaline, Noradrenaline の分離定量に関しても上記の如く種々の問題が存在する事は明らかであるが、焦点を測定法そのものに絞って検討を行った。その結果原報とは相等違つた知見を得られ、測定法をより一層確実にする事が出来たのでこれを発表する。

### 実験及び結果

#### 〔I〕 蛍光光度計及び Filter

蛍光強度測定には島津製八木式微量蛍光光度計 UM 型を使用し、光源には東芝製超高圧水銀 Lamp SHL-100 UV-2 を使用した。

本装置に附属する各種 Filter の組合によつて水銀 Lump からの紫外線の透過の程度を附属する丸型 Cell に蒸溜水を用いて検討した。

結果は第 1 表の如くである。

この結果から遮断 Filter に UV-O<sub>2</sub> を使用するか、遮断 Filter UV-O<sub>2</sub> と撰択 Filter UV-B<sub>2</sub> の組合せを使用する場合の外は非常に大量の紫外線を透過させて蛍光測定を不能にする事が明らかである。

上記の実験で明らかとなつた使用可能の Filter 組合せの中から最良のものを撰択する為次の実験を行った。

pH 6.0 の醋酸曹達緩衝液中に於いて Adrenaline, Noradrenaline を MnO<sub>2</sub> 及び NaOH-Ascorbin 酸混液で処理し、それぞれ対応する Lutine (T.H.I.) としてその蛍光強度を各種 Filter の組合せによつて測定した。

結果は第 2 表に示す。

この結果から同一濃度の Adrenaline 及び Noradrenaline の溶液からは励起 Filter UV-V<sub>1</sub>, 遮断 Filter UV-O<sub>2</sub> の組合せに於いて最良の蛍光強度の測定が出来る事が明らかとなつたので、以後の実験に於いてはすべてこの Filter の組合せを使用した。

第 1 表 Filter の組合せによる紫外線の透過度

Filter		UV-V <sub>1</sub>	UV-V <sub>2</sub>	UV-D <sub>1</sub>	UV-D <sub>2</sub>
UV-O <sub>2</sub>	-	13.5	16.5	3.5	5.5
	UV-B <sub>1</sub>	3.0	5.0	0.8	1.0
	UV-B <sub>2</sub>	5.7	5.0	1.4	2.0
UV-O <sub>1</sub>	-	97.0 (10)	92.0 (10)	19.0 (10)	29.0 (10)
	UV-B <sub>1</sub>	32.0 (10)	40.0 (10)	8.0	13.0
	UV-B <sub>2</sub>	7.0	8.0	13.0	12.5
-		23.0 (10)	55.5	12.0 (10)	17.5 (10)
UV-O <sub>1</sub>	IF-53	60.5	22.0	27.0	38.5
UV-O <sub>2</sub>		1.0	1.0	0.4	0.5
	UV-B <sub>1</sub>	63.0 (10)	74.0 (10)	24.0	35.5
	UV-B <sub>2</sub>	9.0	9.0	2.5	4.5

Light adjustment 10

Sensitivity 100 又は 10 (10 の場合のみ記載)

丸型 Cell 蒸溜水

第 2 表 各種 Filter の組合せによる Adrenolutine, Noradrenolutine の蛍光強度

励起 Filter	遮断 Filter	撰択 Filter	Adrenolutine	Noradrenolutine
UV-D <sub>2</sub>	UV-O <sub>1</sub>	-	50.0 (10)	-
	UV-O <sub>2</sub>	-	50.0 (100)	38.0 (100)
UV-D <sub>1</sub>	UV-O <sub>2</sub>	-	34.0 (100)	-
UV-V <sub>2</sub>	UV-O <sub>2</sub>	-	100.0 (100)	61.0 (100)
UV-V <sub>1</sub>	UV-O <sub>2</sub>	-	14.0 (10)	100.0 (100)
	UV-O <sub>3</sub>	B <sub>1</sub>	18.0 (100)	16.5 (100)
	UV-O <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	75.0 (100)	57.0 (100)
	-	B <sub>2</sub>	105.0 (100)	72.8 (100)

Adrenaline, Noradrenaline 0.10 $\mu$

pH 6.0 MnO<sub>2</sub> 10mg

Light adjustment 10 Sensitivity 100~10

丸型 Cell

〔Ⅱ〕  $MnO_2$  による Adrenaline 及び  
Noradrenaline の酸化

Adrenaline は公衆衛生院より分与された 1-Adrenaline 重酒石酸塩、1-Noradrenaline は Schönlig 社製、1-Noradrenaline 塩酸塩を使用した。

Lund 法 (1949) では Adrenaline, Noradrenaline の酸化に二酸化 mangan を使用しているが、この操作及び成績について疑問の点が数々出て来たので検討を加へて次の実験を行った。

実験に使用した  $MnO_2$  は鹿印特級を水洗した後乾燥し、完全に蛍光性不純物を除去した物を使用した。

(1) Adrenolutine, Noradrenolutine の蛍光強度と  $MnO_2$  量の検討

pH 3.0 及び 6.0 の醋酸及び醋酸曹達緩衝液 15.0ml 中に 0.10 $\mu$ g の Adrenaline, Noradrenaline を含有する溶液を調製し、これに各々 10, 20, 30, 50, 75, 100, 200 及び 300mg の  $MnO_2$  を加へ室温で 60 秒振盪後、東洋濾紙 No. 6 で濾過、濾液 10.0ml に 20% NaOH (Ascorbin 酸含有) 0.1ml を添加後混和し、5~10分後にその蛍光強度を測定した。

結果は第 3 表に示す。

(2)  $MnO_2$  10mg に依る Adrenaline, Noradrenaline の酸化と pH の関係、及び  $MnO_2$  に依る酸化と Euler, Floding の

$K_3Fe(CN)_6$ ,  $ZnSO_4$  に依る酸化法との比較

前の実験によつて Adrenaline, Noradrenaline の酸化に用いる  $MnO_2$  は 10mg で最良の結果を得る事が判明したので pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 及び 7.0 の醋酸曹達緩衝液 15.0mg 中に 0.10 $\mu$ g 宛の Adrenaline, Noradrenaline を含有する溶液を調製し、これらに各々 10mg の  $MnO_2$  を加へ前の実験と全く同様に処理し各々の蛍光強度を測定した。同時に Euler, Floding の  $K_3Fe(CN)_6$  及び  $ZnSO_4$  による酸化を全く同様な条件で実施した。

以上の結果を第 4 表及び第 1 図に示す。

(3) 各種 pH に於ける  $MnO_2$  による Adrenaline, Noradrenaline の酸化により形成された Lutine の蛍光強度と濃度の関係

$MnO_2$  は 10mg を使用した。pH 3.0 より 8.0 に至る各種水素 Ion 濃度の緩衝液 15.0ml (醋酸曹達) にそれぞれ 0.02 $\mu$ g~0.10 $\mu$ g の Adrenaline, Noradrenaline を含有する様に調製し、これに  $MnO_2$  を添加し、常法に依り Lutine を形成させその蛍光強度を測定した。

この結果は第 5 表及び第 2 図に示す。

以上の実験結果より Lund (1949) が Adrenaline, Noradrenaline の酸化に使用した  $MnO_2$  100mg は明らかに多すぎて、 $MnO_2$  の量が少い程 Lutine の蛍光

第 3 表 pH 3.0 及び 6.0 に於ける Adrenaline, Noradrenaline 酸化に及ぼす  $MnO_2$  量の影響

$MnO_2$ (mg)	pH	蛍 光 強 度 (%)			
		6.0		3.0	
		Adrenaline	Noradrenaline	Adrenaline	Noradrenaline
10		86.0	55.0	59.5	21.5
20		80.5	46.0	52.5	22.0
30		83.0	38.0	51.0	25.0
50		72.5	33.0	55.0	24.0
75		57.5	26.0	—	—
100		48.0	29.0	50.5	20.5
200		33.0	24.5	39.5	22.0
300		28.0	15.5	36.5	—
対 照		17.0	18.0	20.0	20.0

Adrenaline, Noradrenaline 0.10 $\mu$ g  
Filter UV-V<sub>1</sub>, UV-O<sub>2</sub>  
Light adjustment 10~5.4  
Sensitivity 100

第4表 各種pHに於ける Adrenaline, Noradrenaline の  $MnO_2$  及び Euler-Floding 法による酸化

medium の pH	螢光強度 (%)			
	Adrenaline		Noradrenaline	
	$MnO_2$	E. F. 法	$MnO_2$	E. F. 法
3.0	31.0	43.0	14.0	17.0
4.0	38.7	47.5	25.0	24.5
5.0	50.5	55.0	40.5	60.0
6.0	54.5	52.0	49.5	60.0
7.0	50.5	49.5	49.0	57.0
対 照	10.0	10.0	13.5	14.0

Adrenaline, Noradrenaline 0.1 $\mu$ g  
 $MnO_2$  10mg  
 Filter UV-V, UV- $O_2$   
 Light adjustment 4.0  
 Sensitivity 100.0

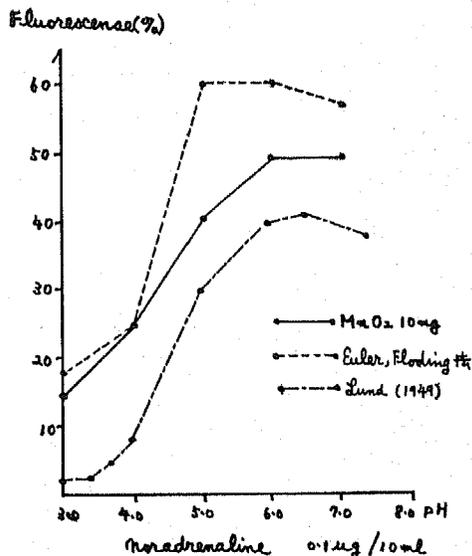
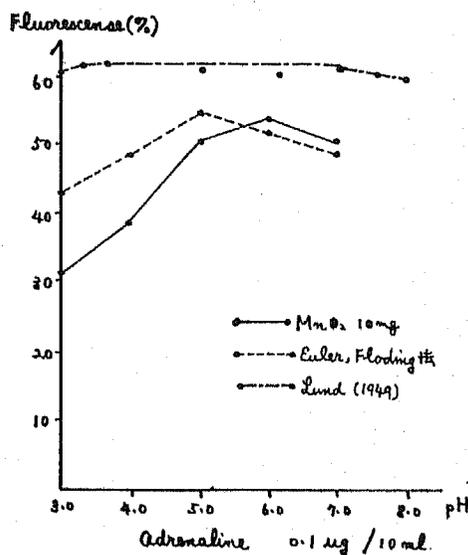
強度が強くなり 10mg で最高の螢光強度を得られる事が知られる。

又 Adrenaline, Noradrenaline の分離定量には pH 3.0 及び 6.0 に於ける被酸化能の相違に依つて行う。

即ち Noradrenaline は pH 3.0 に於いて殆んど酸化されず、これに対して Adrenaline は pH 3.0 及び 6.0 に於いても殆んど同程度に酸化されるという Lund の事実に基いている。 $MnO_2$  の 10mg を用いる酸化法に於いて Noradrenaline が pH 3.0 に於いて  $MnO_2$  の量を増加する時如何なる影響を受けるかといふ疑問がおこる。この点に関しては第3表で示した如く pH 3.0 に於いて Noradrenaline は  $MnO_2$  の量を増加しても殆んど酸化されない。

又 Adrenaline, Noradrenaline が pH 3.0 及び 6.0 で略同程度に酸化されるといふ Lund の実験について検討したが  $MnO_2$  の量を如何に増減してもこの様な結果は行われなかつた。即ち pH 3.0 に於いて Adrenaline の酸化される割合はに pH 6.0 於ける場合より著明に劣る。この場合 pH を 3.5~4.0 とすると Adrenaline の酸化は稍増強されるが pH 6.0 の場合と同程度には達しない。而も pH を 3.0 以上になると Noradrenaline の酸化される割合も著明に増加して分離定量に複雑な要素が混入して、これを困難とする。従つて Adrenaline 及び Noradrenaline の酸化による分離は pH 3.0 に於いて行れるが最適と思はれる。

Fig. 1.



同時に酸化剤として  $K_3Fe(CN)_6$  及び  $ZnSO_4$  を使用する Euler-Floding の法についても検討した。その結果は pH 6.0 に於ける Adrenaline の酸化は  $MnO_2$  を用いる時より劣り、pH 3.0 に於ける Noradrenaline の酸化では、その約 10% が酸化される事が知られ、Adrenaline, Noradrenaline の勝れた分離法ではないと考へられる。

10mg の  $MnO_2$  を用いて Adrenaline, Noradrenaline の各種濃度標準液に就いて各種水素 Ion 濃度に於ける酸化処理を行ふと第5表の如く Adrenolu-

第5表 各種水素 Ion 濃度に於ける Adrenaline, Noradrenaline の濃度と螢光強度の関係 (MnO<sub>2</sub> 10mg による酸化)

Adrenaline						
A. (μg) \ pH	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
対 照	10.0	10.0	10.0	11.0	10.5	10.0
0.02	15.0	18.5	14.0	19.5	—	—
0.04	20.0	24.5	26.0	27.0	—	—
0.06	25.0	32.0	38.0	37.5	—	—
0.08	30.5	40.5	46.0	46.5	—	—
0.10	34.0	47.0	55.0	54.0	55.0	53.5

Noradrenaline						
NA. (μg) \ pH	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
対 照	10.0	10.0	13.5	13.0	13.0	13.0
0.02	13.0	13.5	20.5	19.0	—	—
0.04	13.5	15.0	24.0	24.5	—	—
0.06	13.0	19.0	29.0	30.0	—	—
0.09	13.0	19.5	33.0	34.5	—	—
0.10	14.0	20.0	39.0	41.0	41.0	36.0

Adrenaline, Noradrenaline 0.02~0.10μg  
 Filter UV-V<sub>1</sub>, UV-O<sub>2</sub>  
 Sensitivity 100  
 Light adjustment 10

tine の螢光強度と濃度の間には pH 3.0 から pH 6.0 まで略比例関係が成立し, Noradrenaline に就いても pH 5.0 以上に於いて同様に比例関係が成立する事が判つた。又 pH 3.0 に於いては Noradrenaline は濃度の如何には関らず殆んど酸化されない。

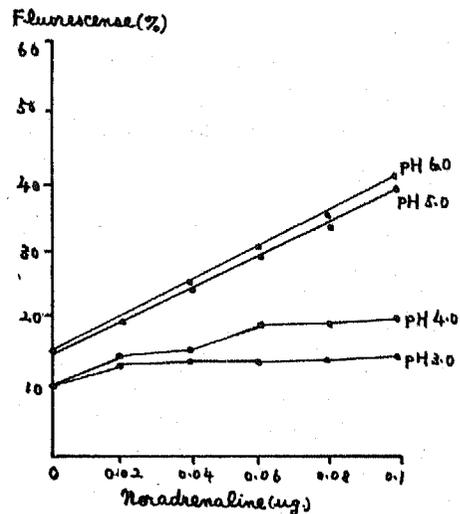
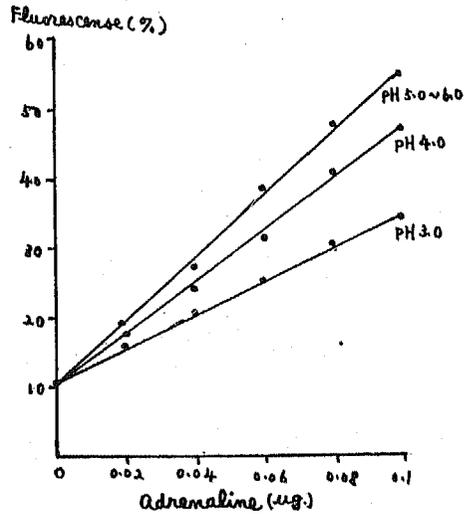
〔Ⅲ〕 Adrenolutine 及び Noradrenolutine の螢光強度の時間的推移についての検討

標準 Adrenaline, Noradrenaline 溶液を pH 6.0 の緩衝液中で MnO<sub>2</sub> により酸化した後, その濾液に Ascorbin 酸含有及び非含有 20% NaOH 溶液を添加して, その対応 Lutine の螢光強度の時間的推移を検討した。

結果は第3図に示す。

此の結果から Adrenolutine の螢光強度の時間的推移について, Ascorbin 酸の存在する時は Lund (1949) の実験と著しい相違は無いが, Ascorbin 酸の存在しない時最低値に下るまで20分を要する事を知る。

Fig. 2.

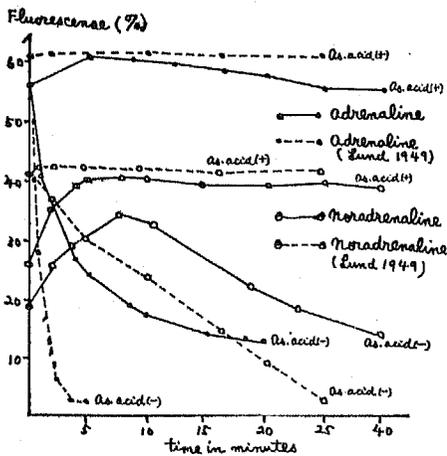


Noradrenolutine の螢光強度の時間的推移を検するに, Alkaline 添加後, Ascorbin 酸の存在する時最高の螢光強度に達するまでに5分間以上を要し, 而して Ascorbin 酸の存在しない時最低値まで下るには40分間以上を要する事が明らかとなつた。

〔Ⅳ〕 酸化 Aluminium による Adrenaline 及び Noradrenaline の吸着に就いての検討

血漿, 血清及び尿中より Catecholamine 分離するには一般に酸化 Aluminium を用いる吸着法が行はれている。Shaw (1938) 以来酸化 Aluminium

Fig. 3.



により Adrenaline, Noradrenaline 等は pH 8.0 以上 8.4 にて特異的に吸着され pH 2.0 以下で容易に溶出されるとされ、Lund 等も試料中からの Catecholamine 分離にはこの分法を使用した。

酸化 Aluminium に依る Catecholamine 分離に就いて検討して次の知見を得た。

酸化 Aluminium は Merck 製 Bnockingmann 標定の Chromatogram 用を使用した。酸化 Aluminium は水洗しただけの物と、Weil-marherbe, Bone (1952) の法により HCl 処理を行つたものについて実験した。

HCl 処理は酸化 Aluminium 100g に 500ml の 2NHCl を加へ 20 分間煮沸後、2NHCl 500ml で洗滌し数日間水洗を繰返へして、Cl<sup>-</sup> の反応が痕跡になるまで処理した。精製した酸化 Aluminium は 300°C で 2 時間熱処理をして desicator 中に保存し、使用前に gas 焔で再び 5 分間熱処理した。

酸化 Aluminium による Adrenaline 及び Noradrenaline の吸着は Batch 法及び Column 法により検討した。

#### (1) Batch 法による酸化 Aluminium の Adrenaline 及び Noradrenaline 吸着能の検討 (HCl 処理酸化 Aluminium)

実験に 0.2M 醋酸-苛性曹達緩衝液を使用した。pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 及び 8.0 の各緩衝液 10ml に 0.8gm の酸化 Aluminium を添加して振盪して放置し若し pH 値が変動していた時は、これを調節して元の pH とした後、これに 0.10 $\mu$ g ~ 0.125 $\mu$ g の

Adrenaline 又は Noradrenaline の標準液を添加して数分間室温で時々振盪して放置する。之を濾過し、濾液の pH を 6.0 に修正し総量を 15.0ml とし、これに MnO<sub>2</sub> 10mg を添加して濾過し、濾液 10.0ml に 1.0ml の 20% NaOH 溶液 (Ascorbin 酸含有) を添加し 10 分後に蛍光強度を測定した。対照には最後に Ascorbin 酸を含有しない 20% NaOH 溶液を添加して 20~45 分間後に測定に使用した。蛍光測定の条件は総て前述の如くに行つた。

結果は第 6 表及び第 4 図に示す。

#### (2) Column 法による酸化 Aluminium の Adrenaline 及び Noradrenaline 吸着能の検討 (HCl 処理酸化 Aluminium)

pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 及び 8.0 の各種水素 Ion 濃度緩衝液に 0.8gm の酸化 Aluminium を懸し、pH を元の値に調節した後、湿式法により Column に充填する。所定 pH の緩衝液中に Adrenaline 又は Noradrenaline 0.10~0.125 $\mu$ g を含有する標準液を Column により処理した。流速は 1 分間に約 20 滴とした。Column を通過した溶液の pH を 6.0 に調節 (NaOH 及び Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液使用) し、一定容量とし MnO<sub>2</sub> 10mg で前述の如く処理して蛍光強度を測定した。

結果は第 7 表及び第 5 図に示す。

#### (3) Column 法による酸化 Aluminium の Adrenaline, Noradrenaline 吸着能の検討 (未 HCl 処理酸化 Aluminium)

HCl 未処理酸化 Aluminium を使用して Adrenaline, Noradrenaline 吸着能を pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 及び 8.0 に於いて Column 法を用いて前述の如く測定した。

結果は次の第 8 表、第 6 図に示す。

以上の実験を総合すると、現今酸化 Aluminium による Adrenaline, Noradrenaline の吸着は pH 8.4 で最も完全に行はれると考へられているが、pH 6.0 で更に完全に行はれる事が判つた。

#### [V] 酸化 Aluminium に吸着された Adrenaline, Noradrenaline の抽出と回収試験

Lund 氏は酸化 Aluminium に吸着された Adrenaline, Noradrenaline の抽出に 5ml の 0.2N 醋酸を使用している。著者等はその 15ml を使用して抽出を行つた。抽出液の pH の調整に Lund 氏は 0.8M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を使用したが、この代りに 2N NaOH して

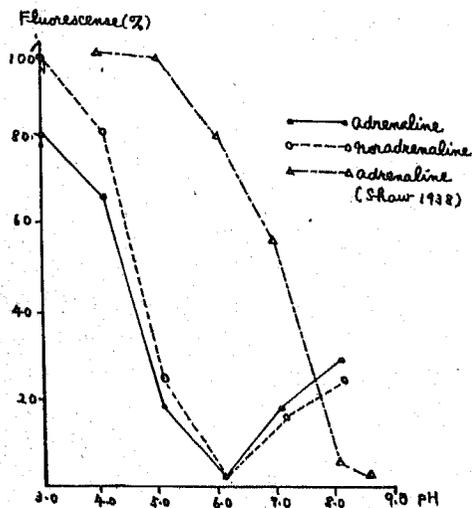
第6表 酸化 Aluminium による Adrenaline の吸着と pH の関係  
(Batch 法による)

pH	酸化 Aluminium (mg)	Adrenaline ( $\mu$ g)	Fluorescence (%)	Unadsorbed Adrenaline ( $\mu$ g)	Unadsorbed Adrenaline (%)
3.0	0.8	0.125	54.0	0.10	80.0
4.0	0.8	0.125	49.0	0.085	68.0
5.0	0.8	0.125	25.0	0.025	20.0
6.0	0.8	0.125	17.5	0	0
7.0	0.8	0.125	24.0	0.20	16.0
8.0	0.8	0.125	29.0	0.35	28.0
	—	0.125	64.0	—	100.0
対 照	—	0.125	17.0	—	—

酸化 Aluminium による Noradrenaline との吸着 pH の関係  
(Batch 法による)

pH	酸化 Aluminium (gm)	Noradrenaline ( $\mu$ g)	Fluorescence (%)	Unadsorbed Noradrenaline ( $\mu$ g)	Unadsorbed Noradrenaline (%)
3.0	0.8	0.10	39.0	0.1	100.0
4.0	0.8	0.10	33.0	0.082	82.0
5.0	0.8	0.10	18.0	0.025	25.0
6.0	0.8	0.10	10.0	0	0
7.0	0.8	0.10	14.5	0.015	15.0
8.0	0.8	0.10	17.0	0.025	25.0
6.0	—	0.10	38.0	0.1	100.0
対 照	—	0.10	10.5	—	—

Fig. 4.



も殆ど障害は見られなかつた。又抽出に醋酸の他に 0.25N  $H_2SO_4$  を使用した結果には殆ど差は見られなかつた。但し  $H_2SO_4$  を用いる時には pH 6.0 附近に至ると著明な沈澱を生じたが Adrenoi-Noradrenolutine の蛍光測定には影響は見られなかつた。

Adrenaline, Noradrenaline の酸化 Aluminium Column 処理による回収試験を行った。実験方法は次の通りである。

0.10 $\mu$ g の Adrenaline は Noradrenaline を含む pH 6.0 の 0.2N 醋酸 -NaOH 緩衝液を酸化 Aluminium Column で処理した後、Column を 15ml の 0.2N 醋酸で抽出し、この溶液の pH を NaOH 又は  $Na_2HPO_4$  で 6.0 に調整して後一定の容積として前述の方法で Lutine とし、その蛍光強度を測定した。対照として次の 2 組の実験を行った。

(1) 15ml の 0.2N 醋酸溶液中に 0.1 $\mu$ g の Adrenaline 又は Noradrenaline を含む標準液を調製し、

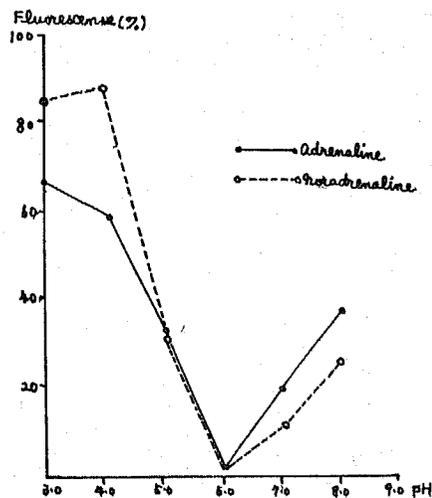
第 7 表 酸化 Aluminium による Adrenaline の吸着と pH の関係  
(Column 処理による)

pH	酸化 Aluminium (gm)	Adrenaline ( $\mu$ g)	Fluorescence (%)	Unadsorbed Adrenaline ( $\mu$ g)	Unadsorbed Adrenaline (%)
3.0	0.8	0.10	31.0	0.065	65.0
4.0	0.8	0.10	21.0	0.059	59.0
5.0	0.8	0.10	21.5	0.033	33.0
6.0	0.8	0.10	12.0	0	0
7.0	0.8	0.10	17.5	0.02	20.0
8.0	0.8	0.10	26.0	0.038	38.0
6.0	—	0.01	40.5	—	100.0
対 照	—	0.10	12.0	—	—

酸化 Aluminium による Noradrenaline の吸着と pH の関係  
(Column 処理による)

pH	酸化 Aluminium (gm)	Noradrenaline ( $\mu$ g)	Fluorescence (%)	Unadsorbed Noradrenaline ( $\mu$ g)	Unadsorbed Noradrenaline (%)
3.0	0.8	0.10	28.0	0.088	88.0
4.0	0.8	0.10	29.0	0.092	92.0
5.0	0.8	0.10	14.0	0.03	30.0
6.0	0.8	0.10	8.0	0	0
7.0	0.8	0.10	10.0	0.011	11.0
8.0	0.8	0.10	13.0	0.025	25.0
6.0	—	0.10	—	0.10	100.0
対 照	—	0.10	8.5	—	—

Fig. 5.



この pH を NaOH 又は  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  で 6.0 として後、一定の容積として Lutine とした。

(2) 15ml の 0.2N 醋酸溶液中に 0.1 $\mu$ g の Adrenaline, Noradrenaline を含む標準液を酸化 Aluminium Column を通して前述の如く処理し Lutine としその蛍光強度を測定した。

この結果は次の第 9 表に示す。

以上の実験より Adrenaline 及び Noradrenaline の標準液を 0.2N 醋酸溶液に加へこれをそのまま酸化 Aluminium Column を通過処理するだけで約 20% 減少する事を知る。故に Adrenaline, Noradrenaline を pH 6.0 に於いて酸化 Aluminium Column で処理して吸着させて後 0.2N 醋酸で抽出して対照とする Adrenaline, Noradrenaline の標準液をそのまま Lutine としたものと比較しても 100% の回収率は得られない。併し Adrenaline, Noradrenaline 標準液を 0.2N 醋酸溶液のまま Column 処理した濾液を対照と

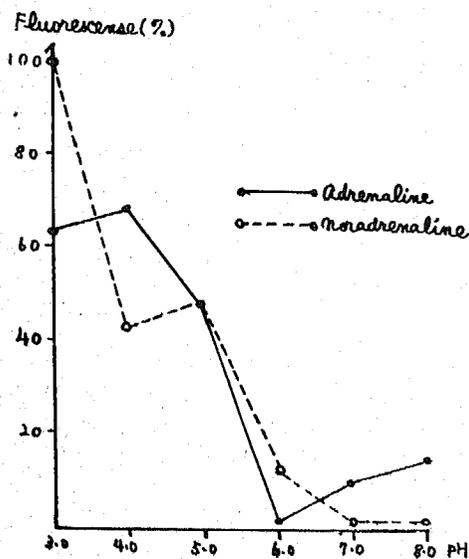
第8表 酸化 Aluminium による Adrenaline の吸着と pH との関係  
(未 HCl 処理酸化 Aluminium, Column 処理)

pH	酸化 Aluminium (gm)	Adrenaline ( $\mu$ g)	Fluorescence (%)	Unadsorbed Adrenaline ( $\mu$ g)	Unadsorbed Adrenaline (%)
3.0	0.8	0.1	41.0	0.062	62.0
4.0	0.8	0.1	44.0	0.069	69.0
5.0	0.8	0.1	34.0	0.047	47.0
6.0	0.8	0.1	14.0	0	-
7.0	0.8	0.1	19.0	0.012	12.0
8.0	0.8	0.1	21.5	0.016	16.0
6.0	-	0.1	57.0	-	100.0
	-	0.1	13.0	-	-

酸化 Aluminium による Noradrenaline の吸着と pH の関係  
(未 HCl 処理酸化 Aluminium, Column 処理)

pH	酸化 Aluminium (gm)	Noradrenaline ( $\mu$ g)	Fluorescence (%)	Unadsorbed Noradrenaline ( $\mu$ g)	Unadsorbed Noradrenaline (%)
3.0	0.8	0.1	53.0	0.10	100.0
4.0	0.8	0.1	31.0	0.043	43.0
5.0	0.8	0.1	32.5	0.047	47.0
6.0	0.8	0.1	18.0	0.015	15.0
7.0	0.8	0.1	12.0	0	0
8.0	0.8	0.1	12.0	0	0
6.0	-	0.1	54.0	0.10	100.0
対照	-	0.1	12.5	-	-

Fig. 6.



すると略 100% の回収率を得る。これで pH 6.0 で完全に吸着されなかつたといふ疑問が起るが、pH 6.0 で Column 処理した濾液中に Adrenaline, Noradrenaline が略存在しない事は第 9 表によつて明らかである。

故に Column 処理による Adrenaline, Noradrenaline の減少の原因は不明である。厳密な Adrenaline, Noradrenaline の標準液の対照としては醋酸溶液のまま Column 処理した濾液使用するのが合理的と考へられる。

#### [VI] 濾紙中の螢光性不純物とその除去法の検討

螢光度測定に於いては使用する試薬類、その他の中に存在する螢光性不純物によつて重大なる影響を受ける。著者等が使用した東洋濾紙 No. 6 の中に製品により、多量の螢光性物質が存在したのでその除去法につ

第9表 酸化 Aluminium Column 処理 Adrenaline, Noradrenaline  
の回収試験

## Adrenaline

Adrenaline ( $\mu\text{g}$ )	酸化 Aluminium (gm)	Column 処理	Elution	Fluorescence (%)
0.1	0.8	+	-	12.0
-	-	-	0.2N 醋酸 15ml	28.0
0.1	0.8	対照実験	(2)	28.5
0.1	-	対照実験	(1)	30.0
対 照	-	-	-	11.5

## Noradrenaline

Noradrenaline ( $\mu\text{g}$ )	酸化 Aluminium (gm)	Column 処理	Elution	Fluorescence (%)
0.1	0.8	+	-	12.0
-	-	-	0.2 N醋酸 15ml	24.5
0.1	0.8	対照実験	(2)	25.0
0.1	-	対照実験	(1)	27.0
対 照	-	-	-	11.5

Filter UV-V<sub>1</sub>, UV-O<sub>2</sub>

Sensitivity 100

Light adjustment 10

第10表 濾紙中の蛍光性物質の除去法の検討

処 理 方 法	Fluorescence (%)
未処理濾紙を蒸溜水 10.0ml 宛で水洗	
第1回 洗液	29 ~ 30%
第2回 洗液	24%
第3回 洗液	22%
水洗を多量の蒸溜水中で48時間以上処理乾燥した濾紙	18%
沸騰水で処理, 乾燥した濾紙	16 ~ 17%
Soxlet の装置で Alcohol 処理した濾紙	24%
対照, 蒸溜水	13%

Filter UV-V<sub>1</sub>, UV-O<sub>2</sub>

Light adjustment 10

Sensitivity 100

いて検討した。即ち蒸溜水並びに Alcohol による処理を行つて、次の結果を得第10表に示す。

以上の結果より濾紙を次の如く前処理した。大量の蒸溜水中に濾紙を浸し、数回水を更へ、濾紙の配列を移動させ48時間以上放置後 70°C で乾燥し、抽出検査で略螢光物質が一定となつた事を確めて使用した。かくする事により一定の対照値を得る事が出来た。

#### [VI] Catecholamine の測定法

##### (1) 血漿 Catecholamine の定量

試薬 2% NaF-3% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 混合液

0.2N 醋酸ソーダ緩衝液 (pH 6.5)

0.2N 醋酸

Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Merck 製, Brockmann 標定クロマト分析用を塩酸処理した。(100g の Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> を 2N 塩酸 500ml にて 20 分間煮沸し水洗後 300°C で 3 時間乾燥させ、除湿器中に保存する。) 使用直前に前記の如く熱処理を行つた。

0.5N NaOH

0.8M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液

MnO<sub>2</sub>

20% NaOH

20% NaOH-2% Ascorbin 酸混合液 (1:9)  
2% Ascorbin 酸溶液は使用直前に調製する。

##### 操 作

肘静脈から血液約 20ml を採取し、直ちに 10.0ml の NaF-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 液を添加して混和し、全量を測定する。次いで一定量の血漿をとり同量の 0.2N 醋酸緩衝液を加へ 0.2N 醋酸を滴加し、pH 6.5 とする。Catecholamine の分離は Chromatogram により行つた。Column は内径 10mm 長さ 20cm で下端に硝子綿を施す狭窄部及び下流量調節用に栓を有するものを用いた。Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> は 0.7g をとり、これを 15ml の醋酸緩衝液中に少量宛添加、気泡を除去する為、棒で攪拌する。これを Column に注ぎ、さらに 10ml の醋酸緩衝液で洗滌する。次いで試料を注ぎ濾過速度が毎分 20 滴となる様に調節する。此時必要があれば Column の上部より加圧を行ふ。吸着完了後は 10ml 宛の醋酸緩衝液及び蒸溜水で Column を洗滌する。抽出には 0.2N 醋酸 15ml 及び蒸溜水 5ml を用ふ。

抽出液を目盛付試験管に 4 分する。(A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>) A 及び B には 0.8M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 及び 0.5N NaOH を添加して pH 6.0 及び 3.0 とする。C<sub>1</sub> 及び C<sub>2</sub> も同様にしてそれぞれ pH 6.0 及び 3.0 とするが此は

Blank とする。

A, B, C<sub>1</sub> 及び C<sub>2</sub> に蒸溜水を加へて容量を 12.0ml とする。各試験管に MnO<sub>2</sub> を 10mg 宛添加し 60 秒後濾過する。各濾液 10.0ml を螢光測定用 cell にとり A 及び B には NaOH-Ascorbin 酸混合液 1.0ml, C<sub>1</sub> 及び C<sub>2</sub> には 20% NaOH 1.0ml を添加する。

25 分後に螢光強度を一次 Filter UV-V<sub>1</sub>, 二次 Filter UV-O<sub>2</sub> を用いて測定する。

同時に 0.02μg より 0.10μg の標準 Adrenaline 及び Noradrenaline 溶液を同様に、pH 3.0 及び 6.0 に於いて酸化処理し、Adrenaline 及び Noradrenaline の標準曲線を作成する。又一定濃度例へば 0.05μg の Adrenaline 標準液を pH 3.0 及び 6.0 に於いて酸化処理し、螢光強度を測定する。

試料 A, B, C<sub>1</sub> 及び C<sub>2</sub> の螢光強度をそれぞれ a, b, c<sub>1</sub> 及び c<sub>2</sub> で表はし、pH 6.0 及び 3.0 に於ける Adrenaline の標準液の螢光強度の比を  $\ell$  とする。

(1) Adrenaline 濃度は (b-c<sub>1</sub>) から pH 3.0 に於ける Adrenaline 標準曲線により求める。

(2) Noradrenaline 濃度は {(a-c<sub>2</sub>)-(b-c<sub>2</sub>) $\ell$ } から pH 6.0 に於ける Noradrenaline の標準曲線により求める。

$\ell$  値は著者等の実験に於いては平均 1.7 である。

##### (2) 尿中 Catecholamine の定量

試薬 10N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

5N NaOH

0.2N 醋酸ソーダ緩衝液 (pH 6.5)

0.2 醋酸

Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 血漿の場合と同じ

0.5N NaOH

0.8M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

MnO<sub>2</sub>

20% NaOH

20% NaOH-2% Ascorbin 酸混合液

##### 操 作

予め稀硫酸で以下に保存した 24 時間尿又は 2~12 時間分割尿の一部 (50~100ml) に 10N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を添加して pH を 1~2 とする。100°C の水浴中で約 20 分水分解し濾過する。この濾液の pH を 0.5N NaOH で 6.5 とし、血漿の場合の如く Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 処理を行い以下全く同様に螢光強度を測定し、Adrenaline 及び Noradrenaline 濃度を求める。

#### [VII] 健康者に於ける血漿及び尿中 Catecholamine 濃度測定値 (中多)

## 血漿 Adrenaline 及び Noradrenaline 濃度

			Adrenaline ( $\mu\text{g}/\ell$ )	Noradrenaline ( $\mu\text{g}/\ell$ )
1	♂	36	1.1	0
2	♀	28	1.2	0
3	♀	26	3.8	0
4	♀	23	4.5	0
5	♀	32	5.6	0
平均			3.2	0

尿中 Adrenaline 及び Noradrenaline 排泄量  
(24時間尿)

			Adrenaline ( $\mu\text{g}/\ell$ )	Noradrenaline ( $\mu\text{g}/\ell$ )
1	♀	33	3.3	4.9
2	♂	52	3.8	5.1
3	♀	34	5.8	11.0
4	♀	38	7.3	11.8
5	♀	26	7.5	6.8
平均			5.5	9.2

## 総括並びに結論

Lund 氏の T. H. I. 法による Adrenaline, Noradrenaline の分離定量法を検討した結果を総括すると以下の如くである。

(1)  $\text{Al}_2\text{O}_3$  による Catecholamine の吸着に就いて、Lund 佐野氏他多数の報告は pH 8.0~8.5 に於いて最も良く行はれるとしているが、著者等の実験に於いては、Adrenaline, Noradrenaline 共に pH 6.0 に於いて完全に吸着される事が判明した。この事実は Medium の pH の上昇による Catecholamine の酸化分解を防止するのに有効であると考へられる。

(2) Adrenaline, Noradrenaline をそれぞれ Adreno 及び Noradrenochrome に酸化する為に Lund 氏は  $\text{MnO}_2$  100mg を用いているが、これでは満足な結果は得られず 10mg を用いる時最良の結果を得る事を明らかとした。さらに Euler, Floding 氏酸化法と比較して同程度の結果を得られる事を明らかとした。

(3) pH 3.0 及び 6.0 に於いて Adrenaline は酸化剤により同程度の酸化を受け Adrenochrome になると云う Lund 氏の報告は疑問であり、著者等の実験により、Adrenaline の pH 3.0 に於ける酸化は pH 6.0 に於けるそれよりも弱く、各種濃度について検討

して後者の場合の 65~75% にしか達せぬ事を明らかとした。この傾向は Euler, Floding 氏の  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  及び  $\text{ZnSO}_4$  を使用する酸化法に於いても明らかに認められた。従つて Adrenaline が pH 3.0 及び 6.0 に於いて同程度に酸化を受けるという事に基礎を置く Adrenaline, Noradrenaline の分離定量法は不適当と考へられる。

(4)  $\text{MnO}_2$  による pH 3.0 に於ける Noradrenaline の酸化は殆んど無視出来る事を明らかにした。これに対し、Adrenaline は pH 3.0 に於いてもある程度酸化を受け濃度と Adrenolutine の蛍光強度との間に比例関係が成立し、又 pH 6.0 及び 3.0 に於ける酸化による Adrenolutine の蛍光強度との間には濃度に関らず一定の比が成立する事を明らかにした。以上の事実より Adrenaline, Noradrenaline を分解定量出来る事を明らかにした。

(5) 使用する濾紙中に含まれる蛍光性不純物について対策を考案した。

稿を終るに当り、御懇切なる御指導御校閲を賜つた藤村教授に深甚の謝意を表します。

## 参考文献

- ①Lund, A. Acta pharmacol. 5, 75 (1949)
- ②Lund, A. Acta pharmacol. 5, 231 (1949)
- ③Lund, A. Acta pharmacol. 6, 137 (1950)
- ④Weil-Malherbe, H. & Bone, A. D. Biochem. J. 51, 311 (1952)
- ⑤Weil-Malherbe, H. & Bone, A. D. Lancet, 264, 974 (1953)
- ⑥Weil-Malherbe, H. & Bone, A. D. Biochem. J. 58, 32 (1954)
- ⑦Weil-Malherbe, H. & Bone, A. D. Biochem. J. 67, 65 (1957)
- ⑧Euler, U. S. v. & Floding, I. Acta physiol. scandinav. 33, Suppl. 118: 45 (1955)
- ⑨Volk, A. DET & Price, H. L. J. Clin. Invest. 35, 837 (1956)
- ⑩Euler, C. v., Euler, U. S. v. & Floding, I. Acta physiol. scandinav. 33, Suppl. 118, 32 (1955)
- ⑪今泉礼治・佐野馨 日内分泌誌. 33, 932 (1958)
- ⑫石垣健一 日内分泌誌. 34, 999 (1959)