

ヒト尿中エピネフリンの蛍光定量のための曇点抽出/フロー分析法

徳島大学大学院医歯薬学研究部（薬学系） 田中 秀治

イオン性界面活性剤の水溶性は、ある温度 (クラフト点 Kraft point) 以上になると急激に増大する。これは、同活性剤の溶解度が温度とともに増大し、クラフト点において、臨界ミセル濃度に達するためである。一方、非イオン界面活性剤の水溶液では、ある温度 (曇点, 曇り点 cloud point, clouding point) 以上になると沈殿生成が起こり、溶液が白濁する。これは、温度上昇に伴う熱運動の増大によって、非イオン界面活性剤分子の極性基の脱水和が起るためである。曇点抽出 cloud point extraction は、非イオン界面活性剤のミセルに可溶化させたのち曇点以上に加温することで、目的物資を界面活性剤相に分離濃縮する方法である。

Davletbaeva らは、ヒト尿中のエピネフリン (アドレナリン) の簡便・迅速・高感度定量を目的とした、オンライン曇点抽出と蛍光検出を組み入れたフロー分析法について報告した。エピネフリンは副腎髄質や神経細胞から分泌され、神経伝達物質として交感神経興奮作用を発揮する。尿中のエピネフリン濃度は、副腎や神経組織の腫瘍、高血圧症、狭心症、喘息、肝炎、肝硬変、脳障害などで変化するため、しばしば臨床検査の対象となる。彼らが開発したシステムの概要を Fig. 1 に示す ("stepwise injection analysis" という独自の分析法であると主張しているが、シーケンシャルインジェクション分析法とそれほど変わらないように見受けられる)。Fig. 2 には、エピネフリンの発蛍光反応を示す。非イオン界面活性剤としては、室温範囲内に曇点があり (28 °C) 扱いやすいことから Triton X-114 (polyethylene glycol (7-8) p-isooctylphenyl ether) が用いられた。

まず、試料 (0.25 mL) および NaOH (0.1 mL, 反応促進のため 2 v/v% のアセトンを含む) が混合室 (30 mL) に送られ、空気を 2 mL/min の流量で 8 分間流してエピネフリンからキノン誘導体への反応を行う。続いて発蛍光試薬 (0.4 mL) が加えられ、6 分間の通気・加熱により蛍光誘導体化を行う。3 分間放冷後、Triton X-114 溶液 (0.13 mL) が加えられ、1 分間通気後、混合液はシリンジポンプへと送られる。ここに塩析剤として 1 M Na₂CO₃ (0.15 mL) が加えられ、ポンプのピストンを 3 往復上下動することで塩析を進行させる。1 分間放置後、上層を捨て、下層 (ミセル相) を蛍光検出器に導いて、励起波長 447 nm, 蛍光波長 550 nm のもとで蛍光強度を測定する。測定後、系内は水で洗浄される。

最適化条件のもとで得られた検量線の直線範囲は、 $1 \times$

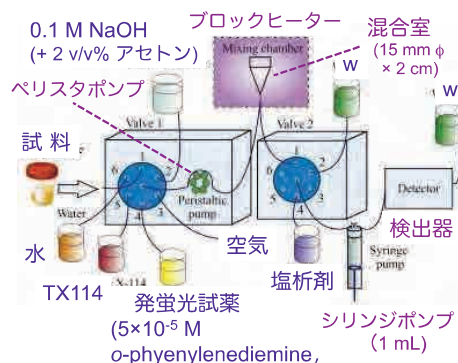


Fig. 1 Flow system of cloud point extraction - fluorometric determination of epinephrine in human urine

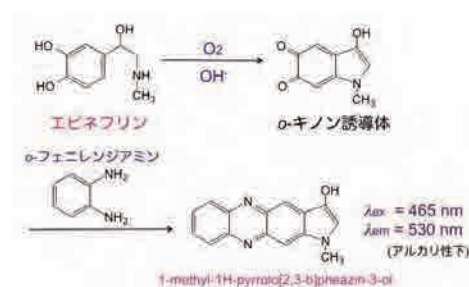


Fig. 2 Fluorogenic reaction for epinephrine

$10^{-11} \sim 5 \times 10^{-7}$ M であり、尿中のエピネフリン濃度の正常値 ($\sim 1.5 \times 10^{-7}$ M) を十分にカバーできる。検出限界 (3 σ) は 3×10^{-12} M であり、(論文著者らの調査による限り) 既報フロー分析法のそれより 3 桁ほど低い。相対標準偏差は 2 % 以下である。尿中の通常レベルの共存物質は測定に影響しない。分析効率は 1 時間あたり 3 試料であり、高くはないが、オンライン濃縮過程を含んでいることを考慮すると妥当とも言える。健常者 6 名の尿の分析結果は、対照法 (固相抽出-逆相 HPLC) による結果と有意な差がなく、添加回収試験 (添加濃度: 1.0×10^{-8} , 5.0×10^{-8} M) では、 100 ± 1 % の良好な回収率が得られた。

彼らのシステムは、シリンジポンプや検出器における温度制御の精密さが不明であるが、曇点抽出をフロー系に組み入れ、尿中のエピネフリン定量に応用した点で興味深い。

Reference

- [1] P. Davletbaeva, M. Falkova, E. Safonova, L. Moskvina, A. Bulatov, *Anal. Chim. Acta*, **911**, 69 (2016).