

HPLC/Immunoassayによるステロイドの 定量分析

上芝 元, 宮地幸隆, 入江 実
(東邦大学医学部第一内科)

林 時司, 成瀬 浩
(国立武蔵療養所神経センター)

研究目的

先天性副腎皮質過形成 (CAH) をはじめとした副腎皮質疾患におけるステロイド代謝の詳細をプロフィールとして把握できる方法の確立を目的とし, 従来のイムノアッセイにおける交差反応の問題を解決するとともに, 単一試料中の関連ステロイドを一斉分析すべく, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) とラジオイムノアッセイ (RIA) とを組み合わせた血中ステロイドホルモンの定量分析法について検討を行った。

研究方法

血漿100 μ lに蒸留水及び内部標準 (3,7- α -ジメトキンフラボン) の一定量を加えて, エーテル抽出した。その後, エーテル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後, 蒸発乾固した。残渣を40%エタノールで再溶解してHPLC用試料とした。使用したHPLC装置の概要はFig. 1に示したが, あらかじめステロイドホルモンの標準品にて各々の保持時間を決定しておき分取できるようにプログラムした。HPLCより各ステロイドの分面を取り, 蒸発乾固し, RIA用試料とした。

研究結果

今回, 林らが新しく開発した非常に再現性の良い gradient programmer を利用して精密分取を行った。各ステロイドの保持時間の再現性は, CV値0.09~0.32%と良好な結果が得られた (n=13)。Fig. 2にこの系によるステロイドの分離例を示す。この分離は, メタノール濃度を変化させる gradient 溶離法で行った。また, 全操作を通しての回収率は78~86%と良好であった。

CAH患児6人 (治療中も含む) の血漿100 μ lを用い, cortisol (F), androstenedione (A) 17 α -hydroxyprogesterone (17-OHP), progesterone (P) についてHPLC/RIAで定量分析を行ったところ, F 1.8~35 μ g/dl, A 0.15~14.6ng/ml, 17-OHP 1.3~114ng/ml, P 1.3~3.8ng/mlとなった。治療前には17-OHP, Aが高値を示し, Fの低値がみられ, 治療とともに17-OHP, Aは低下し, Fが増加した。

考 按

HPLCを用いたステロイドの分析では、UV検出法で定量限界 1 ng/sample 程度と思われ、異常値を示す試料以外は現在のモニタリングではピークとして検出できない。しかし、ピークとして検出できない低濃度の試料でも、今回のように保持時間の再現性が良好であれば分取可能で、それをRIAで測定すれば微量定量でき、なおかつプロフィールとして把握できると思われる。また、RIAのみの測定上問題となる交差反応についても、HPLCと組み合わせることにより信頼性の高いプロフィールの把握が可能と考えられる。

RIAを使用する際には設備の問題があるため、代わりにEIAを用いるHPLC/EIAの系についても現在検討中である。

文 献

- 1) Weisman, Y. et al. : Rapid diagnosis of congenital adrenal hyperplasia by high performance liquid chromatography. Clin. Chim. Acta, 138 : 1-8, 1984.
- 2) Hayashi, T. et al. : Continuous gradient programmer for high-performance liquid chromatography. under preparation.
- 3) Eibs, G. et al. : Simultaneous determination of fifteen steroid hormones from a single serum sample by high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay. J. Chromatogr., 310 : 386-389, 1984.
- 4) Pang, S. et al. : Microfilter paper method for 17-hydroxyprogesterone radioimmunoassay : Its application for rapid screening for congenital adrenal hyperplasia. J. Clin. Endocrinol. Metab., 45 : 1003-1008, 1977.
- 5) 下沢和彦 : 先天性副腎皮質過形成 (21-水酸化酵素欠損症) の新生児マス・スクリーニングに関する研究, 第一編乾燥濾紙血液による血中 17α -hydroxyprogesteroneの測定。日内分泌会誌, 59 : 1845-1859, 1983.

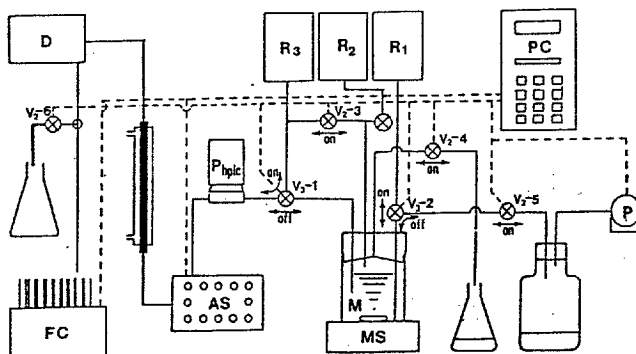


Fig. 1 Schematic Diagram of High-Performance Liquid Chromatographic System for the Analysis of Steroids in Biological Sample

R₁ : reservoir for first solvent, R₂ : reservoir for second solvent,
 R₃ : reservoir for third solvent, PC : programmable controller,
 V : electromagnetic valve, P_{hplc} : pump for mobile phase,
 P : suction pump, M : mixer, MS : magnetic stirrer,
 AS : auto-sample injector, D : UV detector, FC : fraction collector

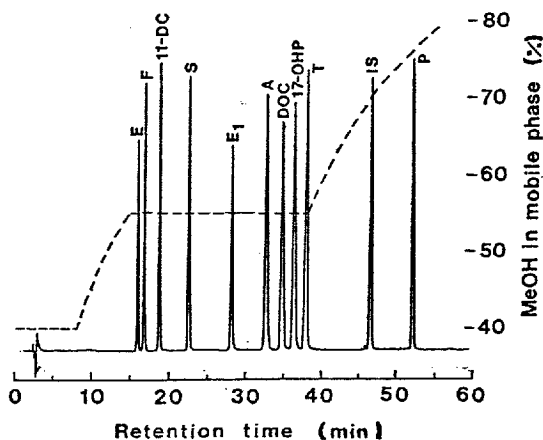


Fig. 2 High-Performance Liquid Chromatogram of a Standard Mixture of Steroids

E : cortisone, F : cortisol, 11-DC : 11-dehydrocorticosterone,
 S : 11-deoxycortisol, E₁ : estrone, A : androstenedione,
 DOC : deoxycorticosterone, 17-OHP : 17 α -hydroxyprogesterone,
 T : testosterone, IS : internal standard, P : progesterone



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



先天性副腎皮質過形成(CAH)をはじめとした副腎皮質疾患におけるステロイド代謝の詳細をプロフィールとして把握できる方法の確立を目的とし,従来のイムノアッセイにおける交差反応の問題を解決するとともに,単一試料中の関連ステロイドを一斉分析すべく,高速液体クロマトグラフィー(HPLC)とラジオイムノアッセイ(RIA)とを組み合わせた血中ステロイドホルモンの定量分析法について検討を行った。