

Catecholamine 에 關하여

—第二編 Catecholamines 의 測定法—

延世大學校 醫科大學 藥理學教室

李 宇 柱

目 次

- I. 緒 論
- II. 生物學的 測定法
 - 1. 血壓法
 - 2. 腸管筋肉法
 - 3. 白鼠子宮法
 - 4. 家兎 耳殼血管法
- III. 物理化學的 測定法
 - 1. 組織 및 體液에서 catecholamine 의 分離 및 精製
 - a. 吸着法
 - b. Chromatographic 分離
 - c. Ion exchange
 - d. Countercurrent distribution
 - e. 透折(Dialysis)
 - f. 加水分解
 - 2. 比色 測定法
 - a. 沃度法
 - b. Permanganate 法
 - c. Shaw 法
 - d. Auerbach 및 Angell 法
 - 3. 螢光 比色法
 - a. Lund 法
 - b. Euler 및 Floding 法
 - c. Weil-Malherbe 및 Bone 法
 - d. Manger 法
 - e. Shore 및 Olin 法
- IV. 組織 化學的 檢出法
- V. Catecholamines 의 代謝物質 測定法
 - 1. Vanillylmandelic acid (VMA) 測定法
 - 2. 尿中 metanephrine 및 normetanephrine 測定法(Pisano 法)
- VI. 參考文獻

I. 緒 論

1856년 Vulpian⁴⁷⁾은 副腎 抽出液이 다른 腺의 抽出液과는 달리 iodine, alkali 또는 햇빛에 의해 rose-carmine 빛깔을 내는 것을 관찰하였으며, 이 반응은 酸에 의해 억제되지만 그 물질 자체는 파괴되지 않음을 알았다. 또 이 物質을 사체의 副腎 정맥혈에서 확인하고, 이는 아마도 生物이 生存時 血液으로 들어가서 여러가지 作用을 하리라고 추측하였다.

이 물질이 epinephrine이라는 것은 요즘은 잘 아는 사실이나 당시엔 그리 큰 관심을 끌지 못하다가 약 40년이 지난 1899년에 Abel¹⁾이 副腎髓質에서 epinephrine을 순수한 結晶體로 抽出하고 이 물질이 生體 各 組織 臟器에 重要한 作用을 일으킴을 점차 알게 되자 epinephrine에 關한 研究는 活發하게 되었다.

이 물질의 생물학적 연구가 활발함에 따라 必然的으로 그 물질의 定量的 測定方法이 要求되었고, 그 定量法이 考案되자 새로운 지식이 開發되었으며, 더욱 精確한 定量法이 發見될 때마다 더욱 새로운 지식을 얻게 되었다.

오늘날 catecholamine 이 hormone 으로서 또는 神經衝動의 傳導體로서 生體에 不可缺의 重要한 生物學的 役割을 하는 물질임을 알게 된 것은 주로 微量의 catecholamine 을 精確하게 測定할 수 있는 새로운 방법이 발견됨에 기인하였다고 하여도 過言이 아니다.

그러므로 本編에서는 catecholamines 의 定量的 測定方法을 소개코저 하며 이를 生物學的 測定法, 物理化學的 測定法, 組織學的 檢出方法 等으로 區分하여 논술하고, 나아가 catecholamine 의 體內 代謝物質의 測定法도 그 개요를 소개코저 한다.

II. 生物學的 測定法

Catecholamines 의 모든 研究面에서 볼 때 生物學的 測定法은 1949년 John Gaddum 等^{21, 22)}에 의하여 改善

된 以來 다른 어떤 方法보다도 거의 變하지 않았다.

副腎髓質 抽出物의 연구 초창기에는 그에 含有된 epinephrine의 量的 檢出은 주로 이 方法에 의존하였으나 점차 epinephrine의 物理化學的 性質이 판명되자 化學的 檢出法이 開發되어 이 生物學的 測定法의 利用이 감소되었다. 그러나 아직도 때에 따라서는 이 方法이 使用되고 더욱이 化學的 方法의 신뢰도는 生物學的 方法과 比較되고 있다.

生物學的인 catecholamine의 測定方法에는 血壓法, 白鼠子宮法, 腸管 筋肉法, 家兎耳殼 血管法등 여러 가지가 있다.

1. 血壓法

Elliott¹³⁾에 의해 처음으로 시작되었으며 그後 Peart (1953)³⁴⁾에 의해 개량되어 이용되었다.

Peart³⁴⁾는 體重 150 gm 以上되는 白鼠를 pentobarbital로 마취하고 총 경동맥에 미세한 유리 cannula를 삽입하여 그 혈압을 kymograph에 그린다. 또 여러가지 혈관 수축제에 對한 反應度를 높이기 위해 hexamethonium 10 mg을 미리 피하주사하고 또한 혈액의 응고를 막기 위해 heparin 50 unit을 정맥주사한다. 이렇게 하여 血壓이 一定하게 된 다음 여러가지 농도의 標準溶液과 被檢物을 各各 정맥에 주사하여 各各의 反應을 比較한다. 주사하는 量은 0.05~0.2 ml로 하고 0.1 ml의 생리적 식염수로 세척, 주사하는 것이 적당하다.

이 方法으로 5 m μ g까지의 epinephrine 또는 norepinephrine을 測定할 수 있다. norepinephrine과 epinephrine의 分離 測定은 paper chromatography를 利用한다.

한편 Elliott¹³⁾는 白鼠 대신에 고양이를 사용하여 0.05~0.1 μ g까지의 norepinephrine을 측정하였다.

즉 이 경우는 체중 2 kg 정도의 고양이에 0.15 mg의 ergot를 근육내 주사하여 homeostatic blood pressure reflex를 제거하고 또 체중 每 kg 당 2 mg씩의 황산 atropine을 皮下 주사하여 반사적인 迷走神經 活動을 봉쇄한다. 그 以外에도 histamine의 유리로 인한 영향을 제거하기 위하여 10 mg의 promethazine을 筋肉內 주사하여 같은 方法으로 測定한다.

2. 腸管 筋肉法

장관의 運動이 epinephrine에 의해 억제된다는 것은 많은 測定法에 利用되어 왔다. 즉 Stewart 및 Rogoff⁴⁴⁾는 토끼의 장관을 利用했으나 가장 예민한 反應은 닭의 剔出 直腸이다. 이 닭의 剔出 直腸은 5 ml의 both에 epinephrine 1 m μ g만 있어도 充分히 反應할 뿐 아니라

norepinephrine에 對해서는 훨씬 弱하게 反應한다(Barsoum 및 Gaddum, 1935)⁵⁾.

닭의 剔出 直腸을 利用하는 方法은 다음과 같다.

즉 1~2歲된 닭을 雌雄의 區別없이 斷頭하여 失血시킨 後 3~4 cm 정도 길이의 直腸을 주의하여 절단하고 그 內容物을 제거한다. Bath 용액은 tyroid액으로 하되 K⁺농도는 보통의 半으로 하고 95% O₂와 5%의 CO₂의 混合氣體를 계속 공급한다. 직장 절편의 一端은 고정하고 一端은 lever를 通하여 kymograph에 그 運動을 묘사한다. 이 절편의 反應度는 처음 10分間이 가장 예민하나 때에 따라선 몇 시간동안 계속 예민한 反應을 보이기도 한다.

이 때 주의할 점은 이 직장 절편이 酸에 對해 민감하므로 측정할 抽出物의 pH를 3.5以下가 되지 않도록 하고 4 또는 그보다 약간 높게 하는 것이 좋다.

3. 白鼠 子宮法

子宮 組織은 epinephrine에 가장 예민한 조직의 하나로써 epinephrine 0.1 mg까지도 측정할 수 있다.

이는 Jalon²⁷⁾이 처음 소개한 方法으로서 Gaddum 등^{21, 22)}이 개선하여 아주 적은 量의 epinephrine도 정확히 측정할 수 있게 된 方法이다.

즉 자궁 절편을 적은 bath에 매달아 그 內容液을 7~10배로 희석하여 잘게 장치하고, 그 자궁 절편에 carbachol 10⁻⁶ w/v를 적용시켜 약 30초간 자궁운동의 변화를 관찰한 다음 세척한다. 이를 2분 간격으로 반복하여 자궁운동이 일정해지면 epinephrine을 carbachol 투여 1분 전에 적용시켜 자궁운동이 감소된 정도로써 측정한다. 만일 子宮의 反應이 예민치 못 할 경우 phenoxybenzamine (dibenzylamine)을 bath에 적용시키므로 epinephrine에 對한 反應度를 增強시킬 수 있다.

4. 家兎 耳殼 血管法

토끼 血管이 여러가지 血管 수축제에 對하여 예민한 反應을 보인다는 事實은 널리 알려져 있으며, Schlossman⁴⁰⁾은 이를 利用하여 epinephrine을 測定하는 여러 가지 方法을 研究하였다.

이는 家兎 耳殼 動脈에 一定 壓力으로 定速注入할 때 정맥을 通해 灌流되어 나오는 滴數를 기록하여 比較 測定하는 것이다.

이 方法은 血液中的 catecholamines 測定에 많이 使用되나 다른 혈관 수축물질 특히 5-hydroxytryptamine의 混在로 정확한 측정이 곤란한 경우가 있다. 本法으로는 epinephrine 10⁻¹¹ w/v까지 測定할 수 있고 norepin-

ephrine의 반응은 더욱 예민하다.

以上の方法 以外에도 Loewi의 실험 개구리 심장관류법, 고양이 순막법, 개구리 子宮法 등 여러가지가 있다.

실제 여러가지 조직의 추출액은 epinephrine 및 norepinephrine이 함께 포함되어 있으므로 그 각각의 量을 測定할 경우는 두 가지의 實驗方法을 通해 그들의 norepinephrine 및 epinephrine에 對한 反應도를 관찰하여 計算하게 된다. 이 경우 두 catecholamines의 含量의 차이가 10배 이상인 경우 신빙성있게 된다.

예를 들어 組織 抽出液에서 epinephrine(E) 및 norepinephrine(NE)을 各各 測定하면 다음과 같다.

두 測定法에서 抽出液는 組織 gm 당 μg 의 norepinephrine 量으로 했다(보통 組織抽出液에서는 norepinephrine이 epinephrine 보다 많으므로).

A: 닭 直腸法에 의한 組織 gm 당 norepinephrine의 量 (μg).

a: 고양이 血壓法에 의한 組織 gm 당 norepinephrine의 量 (μg).

Q: 닭 直腸法에 의한 epinephrine과 norepinephrine의 活性比

q: 고양이 血壓法에 의한 epinephrine과 norepinephrine의 活性比

$$E \mu\text{g/gm} = x = \frac{A-a}{Q-q}$$

$$NE \mu\text{g/gm} = y = A - xQ$$

$$E의 比較量 = \frac{x}{x+y}$$

그림에 의한 결과로 계산하면 (그림 1 참조)

血壓法에 의한 NE量 1.6 $\mu\text{g/gm}$ a

直腸法에 의한 NE量 2.4 $\mu\text{g/gm}$A

血壓法에 의한 活性比 0.27.....q

直腸法에 의한 活性比 40.....Q

$$E = \frac{2.4 - 1.6}{40 - 0.27} = 0.0202 (\mu\text{g/gm})$$

$$NE = 2.4 - 0.0202 \times 40 = 1.59 (\mu\text{g/gm})$$

$$E\% = \frac{0.0202}{1.59} \times 100 = 1.25 \quad (\text{Euler}^{15})$$

이와 같이 위의 고양이 血壓法 및 닭 直腸法 두가지를 利用하는 것 以外에도 고양이 血壓法과 이의 子宮法을 利用하는 것 또는 瞬膜法과 함께 쓰는法(Burn et al. 1950)⁹⁾, 흰 쥐 直腸과 子宮을 利用하는法(Gaddum 1949)^{21, 22)} 등이 있다. 그러나 이상의 방법은 근본적으로 epinephrine 및 norepinephrine 둘 만이 있을 경우이고 다른 catecholamines는 없는 경우에 한 한다. 실제 대부분의 組織 抽出物이 이 두 가지만 含有하고 있지만 羊의 심장에는 상당량의 dopamine이 含有되어 있다. 그러나 이 경우도 실은 이 dopamine이 이상의 方法에서는 그 活性이 norepinephrine의 1/50~1/100정도 밖에 되지 않아 生物學的 測定에서는 그리 큰 문제가 되지 않는다.

生物學的 測定法에서 먼저 組織 抽出物이 순수하고 농축될 수록 精確성이 클 것은 명백한 일이다. 그러므로 catecholamines의 분리 농축법이 중요하며 이에 關하여는 다음 物理化學的 測定法에서 상술하기로 한다. 대체로는 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 에 catecholamine을 吸着시켜 유리

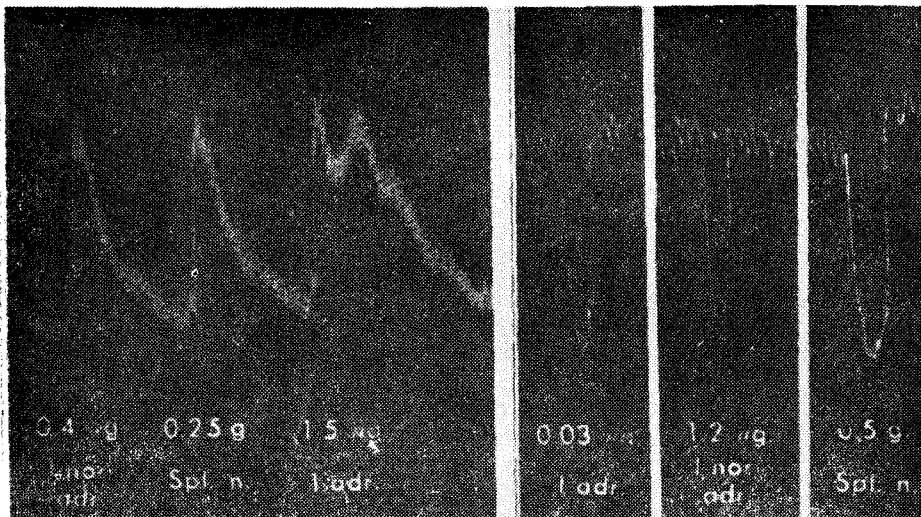


그림 1. 고양이 혈압 및 닭 剔出 直腸 수축 곡선. 표준 epinephrine 및 norepinephrine 용액에 대한 splenic nerve 추출액과의 비교 檢索.

시키는 方法과 paper chromatography 로서 분리 농축시키는 方法이 널리 利用되고 있다.

이 生物學的 測定法은 精確성이 그다지 높지 않고 많은 시간이 소요된다는 결점이 있어 점차 物理化學的 測定法으로 바꾸어 쓰고 있다.

Ⅲ. 物理 化學的 測定法

Catecholamines 測定에 있어서 生物學的 方法이 일찍 부터 널리 使用되었다. 生物學者의 입장에서 볼 때는 예민하고 간단할 지라도 반응을 阻害하는 物質을 內包할 때 化學的으로는 쉽게 除去할 수 있으나 生物學的으로는 除去할 수 없으며, 반복 실험을 할 때 성격의 차이가 심하며, 微量測定에는 精確성이 적다는 등의 短點이 많다(Persky)³⁰. 그래서 物理化學的 測定 方法이 일찍부터 試圖되었으며, Shaw (1938)⁴²가 alumina 로써 catecholamines 를 吸着시켜 分離하는데 성공한 후 많은 比色 測定法이 發表되었으며, 그中 특히 Shaw 法이 가장 널리 利用되었다.

이 方法은 arsenomolybdate 가 catecholamines 에 의해 還元되어 靑色을 나타냄으로 이것을 比色하는 것인데, 실험성적이 높게 나타남으로 Bloor 및 Bullen(1941)²은 이 方法에 對해 비판적인 평가를 했고 현재는 잘 利用되지 않는다.

한편 더욱 예민하고 특수한 方法으로서 螢光比色法이 使用되고 있다. Hueber(1940)²⁶는 血液分析時 epinephrine 용액을 alkali 처리하면 黃綠의 螢光이 나타남을 관찰하였으나 그 지속시간이 너무나 짧았고 pH, 산화제 및 환원제에 對해 예민하기 때문에 利用되지 못하였다. 그後 Lund(1949)^{30, 31, 32}가 epinephrine 을 MnO₂ 로 酸化시키면 강한 黃綠色의 螢光을 나타내며, 이는 trihydroxyindole 의 유도체인 adrenolutin 이라 밝혔다. 이것을 바탕으로 많은 方法이 소개되었고 특히 Bowman 등⁸¹이 spectrophotofluorometer 를 考案 개조함으로써 현재 螢光比色法은 보편화되었다. Catecholamines 의 物理化學的 測定法으로서 組織 및 體液으로부터의 catecholamines 의 精製法, 比色 測定法, 螢光比色法을 소개한다.

1. 組織 및 體液에서 catecholamines 의 分離와精製

a. 吸着法

體液이나 組織의 抽出液에는 catecholamines 측정조각의 화학반응을 阻害하는 物質을 含有하고 있으므로 精

製를 해야한다. permutit, silicic acid⁵⁰ aluminium hydroxide 혹은 alumina⁴², fuller earth⁴¹등을 使用하여 catecholamine 을 吸着시키므로써 阻害物質을 제거할 수 있다.

b. Chromatographic 分離

phenol 을 溶媒로하여 組織²⁸과 尿 抽出液²³을 濾紙 chromatography 하여 K₃Fe(CN)₆로써 發色시키면 catechol 과 quinine 酸化물을 區別할 수 있으며, Euler¹⁶는 0.5 N-HCl 포화 butanol 을 용매로 chromatography column 에 cellulose 와 starch 를 使用하였다.

c. Ion exchange

Bergström 및 Hansson⁶은 amberlite IRC-50을 使用하여 catecholamines 를 分離하였다.

d. Countercurrent distribution

Craig¹¹가 半微量의 epinephrine 과 norepinephrine 을 分離하는데 이 方法을 적용하였다.

e. 透折(Dialysis)

血漿中の catecholamines 를 螢光法으로 測定하고자 할 때 血漿蛋白의 除去目的으로 透折法이 使用된다⁴⁹. Annersten 등²은 이 方法을 利用하여 血清中の 遊離 epinephrine 과 結合 epinephrine 을 分離할 수 있으며 總 catecholamines 의 96~97%는 결합형태로 存在한다고 보고하였다.

f. 加水 分解

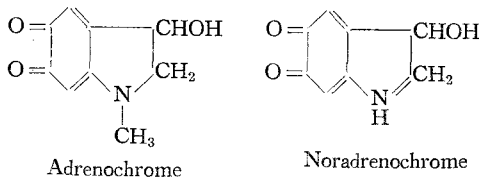
尿나 血漿中에는 catecholamine 이 遊離알칼, glucoside 혹은 ethereal sulfate 상태로 존재한다²⁰. 총 catecholamines 을 측정하려면 결합형태는 加水 分解를 해야하며 이때는 pH 1~2에서 가열한다.

2. 比色 測定法

Epinephrine 과 norepinephrine 은 β -catechol ethanol 이므로 amine phenol 및 alcohol amine 과 類似한 性質을 가지고 있으며, 이中 phenol 의 性質은 化學的 測定法의 기본이 된다. Oxygen, iodine, iodate, manganese dioxide, mercuric nitrate, ferricyanide 및 silver oxide 등의 酸化劑에 의해 酸化가 되면 red quinone 의 유도체를 형성하는데 epinephrine 은 adrenochrome 으로, norepinephrine 은 noradrenochrome 으로 산화되므로 比色 測定할 수 있다^{17, 36}.

Adrenochrome 의 형성은 noradrenochrome 보다 빠르므로 分離 測定이 可能하다. 化學的 測定法은 生物學的으로 活性이 높은 l-form 이나 非活性인 d-form 이다

같이 반응을 하는 短點이 있다.



a. 沃度法(Iodine method)

Norepinephrine 과 epinephrine 을 沃度로써 酸化시키면 색소를 띤 quinon 즉 iodochrome 을 형성하는데 이를 比色 測定한다.

pH 4 에서 iodine 으로 酸化시키면 epinephrine 은 1분 30초內에 完全 酸化되지만 norepinephrine 은 不過 약 10% 정도만이 酸化되지 않으며, pH 6에서는 3분內에 둘 다 完全 酸化되므로 이 原理를 利用하여 epinephrine, norepinephrine 을 分離 測定한다^{13, 29}.

試 藥;

- i) 1N-Acetate buffer pH 4.0과 6.0
- ii) 0.1N-Iodine 용액
- iii) 0.05 N-Na₂S₂O₃
- iv) Epinephrine 과 norepinephrine 標準溶液 100 μg

實驗操作;

i) 0.2~2.0 ml 의 組織 抽出液에 acetate buffer pH 4.0 1 ml 와 0.1 N-iodine 용액 0.2 ml 를 加한 後 정확히 1분 30초 後에 餘분의 iodine 의 제거를 위하여 0.05 N-Na₂S₂O₃ 를 加한다.

ii) 다른 抽出液에 acetate buffer pH 6.0 으로 上記와 같은 操作을 하고 酸化時間은 3分으로 한다. Thio-sulfate 를 加하기 前에 pH 4.0 로 맞춘다.

iii) 模準溶液은 pH. 4.0와 6.0에서 各各 1분 30초 및 3분간 酸化시킨다.

計 算;

a=pH 4.0에서의 吸光度

b=pH 6.0에서의 吸光度

m=E에 對한 calibration factor; $\frac{\mu\text{g E}}{\text{E의 吸光度}}$

n=NE에 對한 calibration factor

P=pH 4.0(1분 30초)에서 NE의 酸化量(약 10%)

$$\mu\text{g E} = m \left[a - P \frac{(b-a)}{(1-P)} \right]$$

$$\mu\text{g NE} = n \left[\frac{b-a}{1-P} \right]$$

이 方法으로써 20~200 μg 범위를 測定할 수 있다.

b. Permanganate 法

pH 가 다른 條件下에서 (pH 4.0, 6.0) iodine 으로 epinephrine 과 norepinephrine 을 酸化하여 형성되는 iodochrome 의 색깔이 약간의 차이가 나므로 permanganate 로 酸化시키는 方法이다(Suzuki Ozaki)⁴⁶.

pH 3.6에서 epinephrine 은 2분 內에 完全酸化되는 反面 norepinephrine 은 10% 미만만 酸化되고 pH. 5.6에서는 兩者가 다 3분 內에 酸化된다.

두 개의 被檢物 1 ml 에 N-acetic acid-acetate buffer 로써 pH 3.6 및 5.6으로 조절한 後 permanganate(potassium permanganate 3 g+증류수 24 ml+lactic acid 8 ml) 0.1 ml 를 加하고 2分 後 pH 3.6에 3分 後에 pH 5.6에 3%-hydrogen peroxide 0.1 ml 씩을 加하여 증류수로 6 ml 되게 희석하여 比色한다.

c. Shaw 法

이 方法이 比色 測定法中 가장 예민하고 epinephrine 과 norepinephrine 混合液에서 半定量이 可能하나 정적이 높게 나타 나므로 널리 使用되지는 않는다.

이 方法의 原理는 arsenomolybdate 가 epinephrine 에 依해 還元되어 靑色을 나타내게 된다는 事實이다.

Shaw⁴²)는 이 方法과 aluminium hydroxide 吸着法을 併用하여 다음과 같은 結果를 얻었다. 즉 epinephrine 을 alkali 로써 전처리하면 색깔이 진해지나 norepinephrine 은 아무런 變化가 일어나지 않는다는 것이다.

試 藥;

- i) Arsenomolybdic acid

Sodium molybdate 60 gm 와 sodium arsenate 10 gm 을 증류수 250 ml 에 용해시켜 濾過한다. 첫 濾液으로 再濾過하고 brome水 5 ml 를 加한 後 증류수로써 500 ml 가 되게끔 희석한다. 使用時 100 ml 餘액에 c-H₂SO₄* 8 ml 를 混合한다.

- ii) 1 : 1 H₂SO₄

- iii) Sulfurous acid

Na₂SO₃·7H₂O 10 gm 을 증류수 50 ml 에 용해시킨다. 每 2日마다 새로 만든다. 使用直前에 이 液 2 ml 에 1 : 1-H₂SO₄ 14 ml 를 加한다.

- iv) 4% NaOH

- v) 1 N-H₂SO₄

- vi) Phenolphthalein

0.1 gm 을 0.01 N-NaOH 100 ml 에 용해(3일간 有効) vii) Al(OH)₃

Potassium alum 25 gm 을 증류수 200 ml 에 가열하여 용해시킨 後 20°C 로 냉각하고 따로 NaOH 5 gm 을

증류수 20 ml에 용해시킨 것을 천천히 잘 흔들면서 혼합한다.

혼합액을 濾過하여 沈澱物을 몇 번 세척하고 증류수 100 ml에 부유시킨다.

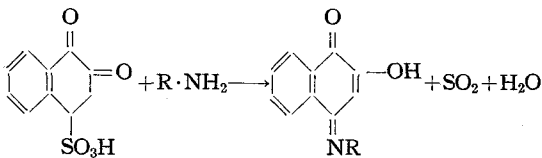
實驗操作：

i) 100~500 m μ g의 epinephrine을 함유하고 있는 被檢物에 2방울의 phenolphthalein을 떨어 뜨리고 4% NaOH로서 中和시킨 後 1 N H₂SO₄한 방울을 加하면 pH 4.0이 된다. Al(OH)₃ 부유액 2 ml를 첨가한 後 잘 혼합시킨 다음 3000 rpm에서 2分間 원침한다. 상층액을 다른 시험관에 붓고 상층액 5 ml당 Al(OH)₃ 1 ml를 加하고 phenolphthalein 한 방울과 NaOH를 떨어뜨려 선홍색이 나타나게 한다. 용액을 흔든 다음 상기와 같이 원침한다. 상층액은 버리고 침전물을 증류수 3 ml로써 세척한 後 증류수 2 ml와 4% NaOH 0.35 ml에 녹여 2분간 방치한다.

ii) 1 N-H₂SO₄ 2 ml를 加한 이 混合液과 arsenomolybdate 0.7 ml를 끓는 水槽中에 미리 넣어 둔 시험관에 옮긴다. 정확히 5分間 加熱한 다음 冷水로 식히고 總량이 5.5 ml되게 하여 靑色을 波長 690 m μ 에서 比色한다.

d. Auerbach 및 Angell 法

Naphthoquinone과 primary amine의 縮合反應을 利用하여 epinephrine과 norepinephrine 混合液中 norepinephrine 測定法이다⁴⁾. 1, 2-Naphthoquinone-4-sulfonate의 sulfonic acid基가 primary amine으로 置換되면 赤紫色을 띄게 되나 secondary amine은 반응하지 않는다.



試藥：

i) Borate buffer

pH 9.6 M/5-H₃BO₃ 50 ml에 M/5-KCl 50 ml를 混合하고, M/5-NaOH 36.85 ml를 加한 다음 200 ml되게 희석한다.

ii) 0.5% sodium- β -naphthoquinone-4-sulfonate 使用直前に 만든다.

iii) 1% Alky dimethylbenzylammonium chloride

iv) 1 : 1-Toluene ethylene dichloride

每日 새로 만든다. 약간의 borate buffer로써 세척한 다음 濾過한다.

實驗操作：

i) 被檢物을 소량의 5% sodium borate에 용해시킨 다음 증류수로써 borax의 농도가 약 1%되게 한다.

ii) 잘 흔들면서 buffer 1 ml 및 naphthoquinone액 0.5 ml를 加한 後 室溫에서 45分 放置한다.

iii) Benzalkonium chloride 0.15 ml와 toluene-ethylenedichloride 混合液 10 ml를 加한 後 강하게 振盪하고 45分 放置하는데 一定한 간격을 두고 5회 정도 진탕한다. 萬一 norepinephrine이 存在하면 용매층이 赤紫色을 띄게 되며 混合液이 혼탁하면 원침하여 색소층을 옮긴다.

3. 螢光 比色法

Hueber(1940)²⁶⁾가 혈액분석시 epinephrine 용액을 alkali 처리하면 황록색의 螢光이 나타남을 관찰한 後 catecholamines의 測定法에 새로운 方法으로 등장하였으며, 더욱 Bowman 등²⁷⁾이 螢光 比色計를 개조 발전시켜 비교적 간단하고 예민한 方法이 되었다.

a. Lund 法

Epinephrine을 MnO₂로써 酸化시키면 강한 황록색의 螢光을 나타내는 3, 5, 6-trihydroxyindole의 유도체인 adrenolutin을 형성한다(Lund, 1949)^{30, 31, 32)}.

Epinephrine과 norepinephrine의 分離 測定은 比色法 때와 같이 pH 3~7에서 epinephrine은 完全 酸化하지만 norepinephrine은 pH 3에서 약 5% 정도 산화되고 pH 6.0~6.5에서 完全 酸化가 일어난다.

實驗操作：

i) 抽出液을 pH 8.5에서 aluminium oxide에 吸着시킨 다음 0.2 N acetic acid로 pH 4 정도 띄게 하고 0.2 N HCl로 pH. 3.0으로 맞춘다. MnO₂를 첨가하여 60 초간 산화시키면 Epinephrine은 完全酸化된다.

다른 抽出液은 0.8 M Na₂HPO₄로써 pH 6.5로 맞추고 MnO₂ 加한 後 20초間 진탕하면 epinephrine과 norepinephrine은 모두 完全酸化된다. NaOH-ascorbic acid를 加한 다음 fluorimeter를 利用하여 490 m μ 에서 螢光도를 測定한다. Aluminium oxide로 吸着시키면 약 20%가 소실되므로 측정치에 1.25를 곱해서 교정을 해야한다.

b. Euler 및 Floding 法

산화제로써 potassium ferricyanide를 使用한다¹²⁾. pH 6.0에서 2分內 epinephrine과 norepinephrine은 酸化되지만 pH 3.5에서 zinc sulfate 存在下에 epinephrine은 3分內에 完全酸化되는 反面 norepinephrine은 약 5% 정도 산화된다(Euler 및 Floding, 1955)¹⁸⁾.

試 藥;

i) Epinephrine 및 norepinephrine 標準溶液

ii) Buffer 용액

1 M Acetic acid-acetate buffer pH 3.5 및 6.0

iii) 0.25% Potassium ferricyanide

iv) 0.5% Zinc sulfate

v) 20% NaOH

vi) 2% Ascorbic acid

vii) NaOH-Ascorbic acid 混合液

使用 直前에 20% NaOH 9 ml 에 2% Ascorbic and 1 ml 의 혼합액을 만든다.

實驗操作;

螢光計의 제1 filter 는 Schott B.G. 12(파장 400~450 μ m), 제2 filter 는 Schott G.G.(파장 500~800 μ m) 11, 14 혹은 Chance OY 4를 사용.

i) 시약 blank

ii) 抽出液 blank

추출액(0.02~0.5 μ g catecholamine)에 buffer 용액 pH 6.0 1 ml 와 NaOH-ascorbic acid 혼합액 1 ml 加하고 증류수로써 10 ml 되게 희석한다.

iii) 標準溶液

0.05~0.2 μ g 의 epinephrine 용액에 potassium ferricyanide 0.1 ml 加하여 2分間 방치後 상기와 같이 操作한다.

iv) 抽出液 pH 6.0

iii)항과 같이 실시

v) 抽出液 pH 3.5

Potassium ferricyanide 0.1 ml 와 zinc sulfate 0.1 ml 를 加한 後 3分間 방치한다. 그 外는 上記와 같이 操作한다.

시약 blank 로써 透過率(transmission) 0에 맞추고 표준용액은 100으로 맞춘 다음 추출액 blank, pH 3.5 및 6.0 추출액의 螢光度를 測定한다.

計 算;

A=pH 6.0에서의 螢光度

B=pH 3.5에서의 螢光度

F=추출액 blank 의 螢光度

a=epinephrine 표준액의 μ g

m=E/NE 螢光度比

n=pH 3.5에서 NE의 酸化率

$$NE=y = \frac{a(A-B)m}{100-n}$$

$$E=x = \frac{a(B-F)}{100} - \frac{ny}{100}$$

c. Weil-Malherbe 및 Bone 法

Lund 方法을 改良하여 catechol 을 酸化시킨 다음 ethylenediamine 과 縮合되어 螢光을 나타내게 된다(Weil-Maltherbe 및 Bone)⁴⁸⁾.

이 方法으로써 epinephrine 은 0.1 μ g%, norepinephrine 은 0.5 μ g%까지 測定할 수 있으니 Lund 法보다 더 靈敏하다. Blue-green filter (Ilford Bright Spectrum filter 623)을 使用하여 螢光度를 測定하면 epinephrine 과 norepinephrine 은 거의 같은 値를 나타내며, yellow filter (Chance OY 4)의 경우는 epinephrine 이 norepinephrine 보다 4.5배 더 강하다. Epinephrine 縮合물은 550 μ m 에서 最大 螢光度를 나타내고 norepinephrine 은 505 μ m 에서 最大를 나타낸다 (Persky 및 Roston)³⁵⁾.

d. Manger 法

Ethylenediamine 이 縮合하기 前에 sodium thiosulfate 를 加하면 epinephrine 의 螢光 發生에는 하등 차이가 없으나 norepinephrine 은 거의 80% 정도 감소한다³³⁾.

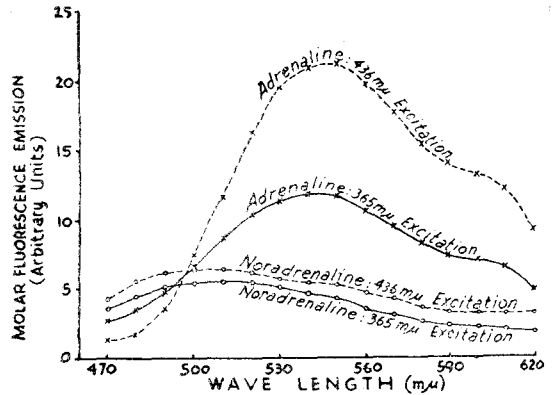


그림 2. Epinephrine 및 norepinephrine 을 ethylenediamine 과 縮合시켰을 때 excitation frequency 436 μ m 와 365 μ m 에서 나타나는 螢光度 (Persky³⁵⁾).

이것은 norepinephrine 이 noradrenochrome 으로 auto-oxidation 될 때 sodium thiosulfate 가 억제한다.

e. Shore 및 Olin 法

Iodine 法을 基礎한 變法인데 組織에 含有된 catecholamines 를 酸性液中에서 butanol 로 抽出하여 butanol 에 溶解된 catecholamine 에 heptane 을 加함으로써 butanol 에 對한 溶解度를 低下시켜 다시 酸性 水溶液中으로 catecholamine 을 移行시킨 後 이것을 沃度로써 酸化시켜 tyirhydroxyindole 유도체로 轉換시켜 spectrophotofluo-

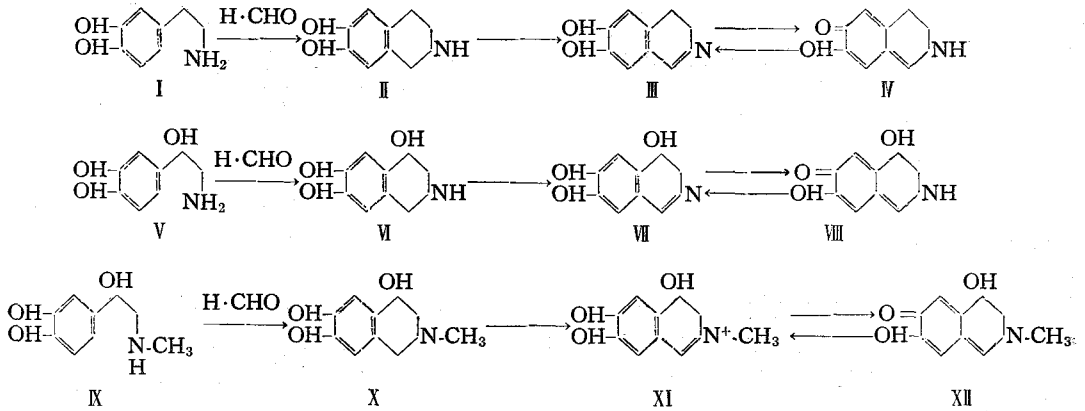


그림 3. Catecholamine 과 formaldehyde 사이의 조직 화학적 반응.

- i) Amines (I, V, K)가 formaldehyde 와 縮合하여 1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinolines (II, VI, X)로 됨.
- ii) 단백 축진 반응에 의해 3, 4-dihydroisoquinolines (III, VII, XI)로 됨.
- iii) 단백질에서 pH 6~10일 때 tautomeric quinoidal型(IV, VIII, XII)으로의 반응이 우세하며 480 mμ의 波長에서 강한 螢光色이 나타남.

rometer를 利用하여 activating wave length 400 mμ, fluorescence wave length 520 mμ에서 螢光度를 測定한다⁴³⁾.

著者は 이 方法을 使用하는데 다음 三篇에서 實驗操作을 詳述하고자 한다.

IV. 組織 化學的 檢出方法

여러가지 生物學的 化合物을 組織化學的 方法으로 檢出하는 方法이 發達됨에 따라 catecholamine에 對해서도 많은 研究가 이루어 졌다(Corradi Jonsson¹⁰⁾, Hervonen²⁴⁾).

그러나 초기의 여러가지 組織化學的 檢出方法들은 신경세포내에 存在하는 微量의 catecholamines, 5-hydroxytryptamine 등에 대하여 그다지 靈敏하지도 못하고 또 특수성도 낮아 다만 副腎髓質이나 enterochromaffin 세포 등에 存在하고 있는 catecholamines 이나 5-hydroxytryptamine을 檢색할 뿐이었다.

그중 중요한 方法들은 chromaffin 반응 potassium iodate 반응 및 Eränkö의 형광법¹⁴⁾등을 들 수 있다. 이 중 螢光法은 그後 많은 研究者 특히 Hillarp 및 그 協同 研究家들에 의해 많은 발전을 이루어 상당히 精確하게 檢出할 수 있게 되었다.

즉 螢光法의 始初는 Carlsson 등에 의해 trihydroxyindole 法으로 微量의 catecholamine에서 螢光色의 발현을 본 것이다. 그러나 이 方法은 실제 使用하는 데 있어서 몇가지 기술상의 애로점 때문에 널리 쓰이지는 못

하였다.

그後 Hess 와 Udenfriend²⁵⁾이 tryptamine을 測定하는데 쓴 螢光 比色法을 Hillarp 이 組織化學的인 方法에 도입하여 새로운 formaldehyde를 利用한 螢光法을 開發하였다.

즉 tryptamine은 formaldehyde와 縮合(condense)되어 tetrahydronorharmine을 형성하고 이는 다시 酸化되어 螢光 norharmine이 된다. 이 사실은 catecholamines를 formaldehyde gas로 처리하면(건조 단백질내에서 行할 경우) 강한 형광빛을 낸다는 事實에 착안한 것이다.

Catecholamines와 formaldehyde 사이의 반응은 그림 3과 같다.

實驗操作(Formaldehyde-induced fluorescence 法)

i) 우선 檢색할 조직의 수분 제거를 위해 냉동 건조시킨다. 즉 -50~-30°C에서 10⁻⁵~10⁻²mmHg의 진공압력으로 1日~6日間 건조시킨다.

ii) 건조後 60~80°C에서 15~10分間 formaldehyde에 노출시킨다.

iii) Formaldehyde로 처리한 조직은 즉시 파라핀에 포매한다. 보다 나은 것은 파라핀보다 epoxy-resin을 쓰는 것이다.

즉 epoxy-resin은 Araldite 502 12 ml, Epon 812 25 ml, dibutylphthalate 4 ml, dodecyl succinic anhydride 2.2 ml 및 benzyl dimethylamine 8방울을 혼합하여 만든다.

iv) 포매한 組織은 1~5 μ 두께로 잘라 현미경으로 관찰한다.

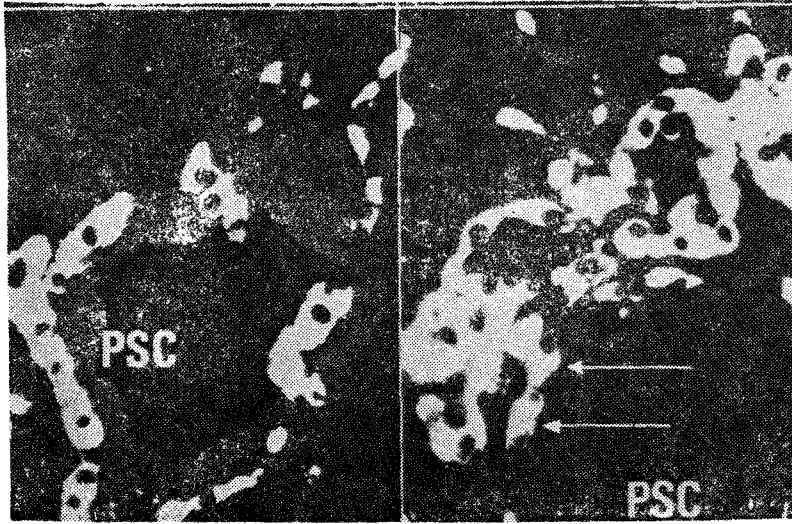


그림 4. 胎兒 副腎의 primitive sympathetic cell (psc) 집단에 함유된 catecholamine을 조직 화학적 방법으로 형광을 발현시켜 검색한 것 $\times 700$ (Hervonen²⁴).

V. Catecholamines의 代謝物質 測定法

Catecholamines가 교감신경 말초나 부신수질 또는 다른 組織의 chromaffin 세포에서 생성 유리되면 이는 여러가지 경로를 거쳐 不活性化되고 또 배설된다(제 1 편 참조). 이中 重要한 것은 효소 즉 monoamine oxidase 및 catechol-O-methyltransferase 에 의한 不活性化 경로로서 이의 中間產物로는 epinephrine에서 metanephrine, norepinephrine에서 normetanephrine이 되나 최종 산물은 epinephrine이나 norepinephrine이나 모두 같이 vanillyl mandelic acid (3-methoxy-4-hydroxy mandelic acid)로 되어 배설된다.

이들 代謝物質의 測定은 임상적으로 상당히 重要한 의의를 가지고 있으며 널리 行해지고 있다.

1. 3-methoxy-4-hydroxy mandelic acid(vanillyl mandelic acid, VMA) 測定法

VMA는 chromatography, 비색법 및 동위원소를 이용하여 測定한다. 즉 Armstrong³⁹은 처음으로 2차원 paper chromatography 로서 分離 測定하였으며, 近來에는 고압(high voltage) 電氣 泳動的으로 分離 測定하기도 한다.

또 比色法을 이용한 것으로는 Sandler 및 Ruthven³⁹의 方法이나 Sunderman⁴⁵등의 方法이 있다. Sunderman

등은 indole과 orthophosphoric acid를 使用하여 발색 측정하였으나 그後 Pisano 등³⁹은 periodate 酸化를 利用하여 VMA를 vanillin으로 變換 測定하였으며 이의 실험 조작은 아래와 같다.

試 藥;

- a) 재증류 ethylacetate
- b) 재증류 toluene
- c) 분석용 sodium chloride
- d) 6N HCl

진한 염산과 같은 量의 증류수와 혼합

- e) 1M potassium carbonate

무수 K_2CO_3 69.1 gm을 증류수에 녹여 증류수로 500 ml까지 희석

- f) 10% Sodium metasilfite ($Na_2S_2O_5$)

$5^\circ C$ 에 냉장할 경우 1주까지 使用할 수 있다.

- g) 2% sodium metaperiodate ($NaIO_4$)

$5^\circ C$ 에 냉장할 경우 2주까지 使用할 수 있다(암실에 보관).

- h) 5N 초산

144 ml의 빙초산을 500 ml까지 증류수로

- i) 3M phosphate buffer

無水 KH_2PO_4 410 gm을 500 ml까지 증류수로 녹여 10N NaOH용액 480 ml를 加하여 혼합하여 1000 ml까지 증류수로 희석하여 pH를 7.4~7.5까지 맞춘다 (pH 7.5 이상이 되지 않게 해야 한다).

j) VMA stock standard; 0.1 gm%

VMA 100 mg 을 0.01 N HCl 에 녹여 100 ml 까지 증류수로 희석 (냉장(5°C)할 경우 3개월까지 쓸 수 있다).

k) VMA working standard; 5 mg%

5 ml 의 stock standard 를 증류수로 100 ml 까지 희석(5°C에 냉장할 경우 1주까지 쓸 수 있다).

實驗操作;

a) 50 ml 의 마개 달린 원침관에 U(가검물), UB(urine blank), S₁ 및 S₂(標準溶液), RB(reagent blank)를 기입한다.

b) 各各의 원침관에

i) U 및 UB;

소변 5 ml + 증류수 0.5 ml

ii) S₁ (25 mg VMA);

working standard 0.5 ml + 증류수 5.0 ml

S₂(50 μg VMA);

working standard 1.0 ml + 증류수 4.5 ml

iii) RB;

증류수 5.5 ml

를 넣는다.

c) 各各의 원침관에 0.5 ml 의 6M HCl, 3 gm 의 NaCl 및 30 ml 의 ethyl acetate 를 추가하고 마개를 막은 후 5분간 강하게 흔든 다음 3분간 원침한다.

d) 상층액(ethyl acetate 층) 25 ml 을 各各 다른 원침관에 옮긴 後 1M K₂CO₃을 1.5 ml 씩 가하고 3분간 강하게 흔들고 다시 3분간 원침한 다음 상층의 ethylacetate 를 suction 제거한다.

e) 各各의 원침관에 UB 만 제외하고 모두 0.15 ml 의 NaIO₄를 加한다.

f) 50°C 의 water bath 에서 30分間 加溫한 다음 冷却시킨다.

g) 다음과 같이 各各 試藥을 加한다. 이 때 pH는 7.2~7.5로 맞춘다.

i) 모든 원침관에 0.15 ml 의 Na₂S₂O₅를 가하여 잔류 NaIO₄를 환원되도록 잘 흔든다.

ii) UB 에 0.15 ml 의 NaIO₄를 加하여 흔든다.

iii) 모든 원침관에 5N 의 초산을 넣어 탄산가스를 유리시키고 또 흔들어서 가스를 제거한다.

iv) 모든 원침관에 3M phosphate buffer 1.0 ml 를 加하여 흔든다.

h) 모든 원침관에 20 ml 의 toluene 를 가하고 마개를 막고 1분간 흔든 다음 3分間 원침하여 하층의 液體를 suction 하여 제거한다.

i) 모든 원침관에 3.5 ml 의 1 M K₂CO₃를 加하고 마개를 막고 역시 진탕한 다음 원침한다.

j) 하층 K₂CO₃액을 cuvet 에 옮겨 Beckman spectrophotometer (DB 또는 DU)로 RB 를 blank 로하여 360 mμ 에서 흡광도(optical density)를 읽는다.

計 算;

mg VMA/24시간 소변

$$= \frac{U \text{ 흡광도} - UB \text{ 흡광도}}{S_1 \text{ 흡광도}} \times S_1 \text{ 농도 (25 } \mu\text{g)}$$

$$\times \frac{24 \text{ 시간 소변량}}{\text{使用소변량(5ml)}} \times \frac{1}{1000}$$

정상치; 1.8~7.1 mg/24시간 소변

2. 尿中 Metanephrine 및 Normetanephrine 測定法 (Pisano 法)³⁷⁾

試 藥;

a) 6 N HCl

b) 2.5 N NaOH

c) 4 N NaOH

d) 4 N Ammonium hydroxide

진한 ammonium hydroxide 와 증류수를 4:11로 섞는다.

e) Amberlite IRC-500, 100~500 mesh;

R-COO⁺형으로 된 ion-exchange resin 이며 쓰기 전 아래와 같이 처리한다.

i) 200 gm 의 resin 을 3배의 증류수와 섞어 10分間 흔든 다음 상층액을 버린다.

ii) 위의 과정을 반복하여 15分間 방치하였을 때 그 상층액이 맑아질 때까지 계속한다.

iii) 상층액을 버린 後 5배의 4 N-NaOH 를 더하여 1時間동안 잘 흔든다.

iv) 상층액을 버린 後 증류수로 3~4회 씻어 나머지 alkali 를 除去한다.

v) 5배의 6 N HCl 을 加해 30分間 잘 흔든 다음 상층액을 버린다.

vi) 다시 증류수로 3~4회 씻는다.

vii) 5배의 4 N NaOH 를 加하여 alkali 형으로 바꾼다.

viii) 다시 증류수로 3~4회 씻는다.

ix) 2배의 50% acetic acid 로 resin 을 부유시키고 잘 흔들어 pH 를 6.0~6.5로 맞춘다.

x) 이 resin 은 chromatography 한 다음 위의 v)~viii)을 반복하므로 다시 使用할 수 있다.

f) Sodium metaperiodate 2%

0.5 gm.의 sodium metaperiodate 를 25 ml 의 증류수에 녹여 냉장한다.

g) 10% sodium metabisulfite

5 gm.의 sodium metabisulfite 를 증류수에 녹여 냉장 한다.

h) 標準 vanillin 용액; 10 mg%

實驗操作;

24시간 소변은 10 ml 의 진한 염산이 함유된 용기에 모은다.

a) 125 ml 들이 Erlenmeyer flask 에 10 ml 의 여과한 소변을 넣고 6N HCl 로 pH 가 1이 되도록 맞춘다.

b) Flask 덮개를 하고 끓는 물에서 20分間 加熱한다.

c) 다시 식힌 다음 2.5 N NaOH 로 pH 6.0~6.5로 맞춘다.

d) 가수분해물을 증류수로 20 ml 가 되도록 한 다음 위의 ionexchange resin 으로 chromatography 를 實施한다.

e) Metanephrine 의 抽出(elution); 4 N ammonium hydroxide 5 ml 로 관류하여 시험관에 10 ml 가 되도록 抽出液을 모은다.

f) 4 ml 의 抽出液을 2개의 시험관(blank 및 test)에 옮긴다.

g) "test" 시험관에 0.1 ml 의 2% sodium metaperiodate 를 넣어 흔들고 1分間 방치한 다음 0.1 ml 의 sodium metabisulfite 를 加한다.

h) "blank" 시험관에는 0.1 ml 의 sodium metabisulfite 를 먼저 넣고 그 다음 sodium metaperiodate 를 加하여 흔든다.

i) "standard" 시험관은 0.1 ml 의 標準 vanillin 용액을 4.1 ml 의 4 N ammonium hydroxide 에 加하여 마련한다.

j) 4 N ammonium 을 "blank"로 하여 360 m μ 에서 spectrophotometer 로 吸光度(optical density)를 읽는다.

計 算;

mg metanephrine/24시간 소변

$$= \frac{\text{"test" 吸光度}}{\text{"stand" 吸光度}} \times \frac{10}{1000} \times \frac{\text{總抽出液量(10)}}{\text{使用한 抽出液(4)}} \times \frac{24\text{時間 소변량}}{\text{使用 소변량}} \times 1.2$$

참 고 문 헌

- 1) Seyler's *Z. physiol. Chem.*, 29:318-362, 1899.
- 2) Annersten, S., Grönwall, A. and Köiw, E.: *The fluorimetric determination of adrenaline in blood plasma. Scandinav. J. Clin. & Lab. Invest.*, 1: 60-69, 1949.
- 3) Armstrong, M.D., McMillan, A. and Shaw, K.N.: *3-Methoxy-4-hydroxy-D-mandelic acid, a urinary metabolite of norepinephrine. Biochim. Biophys. Acta.* 25:422-423, 1959.
- 4) Auerbach, M.E. and Angell, E.: *The determination of arterenol in epinephrine. Science*, 109:537-538, 1949.
- 5) Barsoum, G.S. and Gaddum, J.H.: *The pharmacological estimation of adenosine and histamine in blood. J. Physiol.* 85:1-4, 1935.
- 6) Bergström, S. and Hansson, G.: *The use of amberlite IRC-50 for the purification of adrenaline and histamine. Acta. Physiol. Scand.*, 22:87-92, 1951.
- 7) Bloor, W.R. and Bullen, S.S.: *The determination of adrenaline in blood. J. Biol. Chem.*, 138: 727-739, 1941.
- 8) Bowman, R.L., Caulfield, P.A. and Udenfriend, S.: *Spectrophotofluorometric assay throughout the ultraviolet and visible range. Science*, 122: 32-33, 1955.
- 9) Burn, J.H., Finney, D.J. and Goodwin, L.G.: *Biological standardization. 2nd ed., Oxford Univ. Press, London, England. 1950.*
- 10) Corrodi, H. and Jonsson, G.: *The formaldehyde fluorescence method for the histochemical demonstration of biogenic amines; A review on the methodology. J. Histochem. Cytochem.*, 15:65-78, 1967.
- 11) Craig, L.C.: *Identification of small amounts of organic compounds by distribution studies. J. Biol. Chem.*, 155:519-534, 1944.
- 12) Ehrlén, I.: *Fluorimetric determination of adrenaline II. Farm. Revy*, 47:242-250, 1948.
- 13) Elliott, T.R.: *The control of the suprarenal glands by the splanchnic nerves. J. Physiol.*, 44: 374-409, 1912.
- 14) Eränkö, O. and Härkönen, M.: *Noradrenaline in the adrenal medulla of rats and mice. Endocrin-*

- ology, 57:363, 1955.
- 15) Euler, U.S.v.: *The distribution of sympathin N and sympathin A in spleen and splenic nerves of cattle.* Acta. Physiol. Scand., 19:207-214, 1949.
 - 16) Euler, U.S.v.: *Estimation of adrenaline and noradrenaline in tissue extracts.* Methods of Medical Research. Vol. III, Year Book Publishers, Chicago, pp. 131-141, 1950.
 - 17) Euler, U.S.v.: *Noradrenaline.* Charles C. Thomas, Springfield, Ill. U.S.A. 1956.
 - 18) Euler, U.S.v. and Floding, I.: *A fluorimetric micromethod for differential estimation of adrenaline and noradrenaline.* Acta. Physiol. Scand., 33. Suppl. 118:45-56, 1955.
 - 19) Euler, U.S.v. and Hamberg, U.: *Colorimetric estimation of noradrenaline in the presence of adrenaline.* Science, 110:561, 1949.
 - 20) Euler, U.S.v. and Hellner, S.: *Excretion of noradrenaline and adrenaline, and hydroxytyramine in urine.* Acta. Physiol. Scand., 22:161-167, 1951.
 - 21) Gaddum, J.H. and Lembeck, F.: *The assay of substances from the adrenal medulla.* Brit. J. Pharmacol., 4:401-408, 1949.
 - 22) Gaddum, J.H., Peart, W.S. and Vogt, M.: *The estimation of adrenaline and allied substances in blood.* J. Physiol., 108:467-481, 1949.
 - 23) Goldenberg, M., Serlin, I., Edwards, T. and Rapoport, M.M.: *A chemical screening methods for diagnosis of pheochromocytoma. I. norepinephrine and epinephrine in human urine.* Am. J. Med., 16:310-327, 1954.
 - 24) Hervonen, A.: *Development of catecholamine-storing cells in human fetal paraganglia and adrenal medulla.* Acta. Physiol. Scand. Suppl. 368, 1971.
 - 25) Hess, S.M. and Udenfriend, S.: *A fluorometric procedure for the measurement of tryptamine in tissues.* J. Pharmacol. Exp. Ther., 127:175, 1959.
 - 26) Hueber, E.F.v.: *Über eine einfache methode adrenalin im strömenden blut nachzuweisen.* Klin. Wschr., 19:664-665, 1950.
 - 27) Jalon, P G.De., Bayo, J.B. and Jalon, M.G.De.: *Sensible y nuevo metodo de valoracion de adrenalina en utero aislado de rata.* Farmacoter. act., 2: 313-318, 1945.
 - 28) James. W O.: *Demonstration and separation of noradrenaline, adrenaline and methyladrenaline.* Nature, 161:851-852, 1948.
 - 29) Lecomte, J. and Fischer, P.: *Estimation de l'adrénol en présence d'adrénaline.* Compt. Rend. Séances SOC. Biol. 143/18-18:1294-1296, Paris, 1949.
 - 30) Lund, A.: *Fluorimetric determination of adrenaline in blood. I. Isolation of the fluorescent oxidation product of adrenaline.* Acta. Pharmacol. et toxicol., 5:75-94, 1949 A.
 - 31) Lund, A.: *Fluorimetric determination of adrenaline in blood. II. The chemical constitution of adrenaline (the fluorescent oxidation product of adrenaline).* Acta. Pharmacol. et Toxicol., 5: 121-128, 1949 B.
 - 32) Lund, A.: *Fluorimetric determination of adrenaline in blood. III. A new sensitive and specific method.* Acta. Pharmacol. et Toxicol., 5:231-247, 1949 C.
 - 33) Manger, W.M., Baldes, E.J., Flock, E.V., Bollman, J.L., Berkson, J. and Jacobs, M.: *A method for quantitative estimation of epinephrine and norepinephrine. Preliminary report.* Proc. Staff Meet. Mayo Clin., 28:526-536, 1953.
 - 34) Peart, W.S.: *Cited from "Noradrenaline."* Euler U.S.v. Charles C. Thomas Springfield, Ill. U.S. A. p. 98, 1956.
 - 35) Persky, H. and Roston, S.: *The quantitative determination of adrenaline nad noradrenaline in mixtures.* Science, 118:381-382, 1953.
 - 36) Persky, H.: *Chemical determination of adrenaline and noradrenaline in body fluids and tissue.* Methods of Biological Analysis. Vol II. Interscience Publishers. Inc. New York, pp. 57-82, 1955.
 - 37) Pisano, J.J.: *A simple analysis for normetanephrine and metanephrine in urine.* Clin. Chim. Acta., 5:406-414, 1960.
 - 38) Pisano, J.J., Crout, R. and Abraham, D.: *Deter-*

- mination of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid in urine. *Clin. Chim. Acta.*, 7:285-291, 1962.
- 39) Sandler, M. and Ruthven, C.R.J.: Quantitative colorimetric method for estimation of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid in urine value in diagnosis of pheochromocytoma. *Lancet*, 2:114-115, 1959.
- 40) Schlossmann, H.: Untersuchungen über den Adrenalin Gehalt des Blutes. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.*, 121:160-203, 1927.
- 41) Schmitterlöw, C.: Specific histamine antagonizing and nonspecific, antispasmodic effect of various substances on guinea-pig's isolated intestine. *Acta. Physiol. Scand.*, 16:128-149, 1948.
- 42) Shaw, F.H.: The estimation of adrenaline. *Biochem. J.*, 32:19-25, 1938.
- 43) Shore, P.A. and Olin, J.S.: Identification and chemical assay of norepinephrine in brain and other tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 122:295-300, 1958.
- 44) Stewart, G.N. and Rogoff, J.M.: The action of drugs upon output of epinephrine from the adrenals. *J. Pharmacol.*, 13:95-241, 1919.
- 45) Sunderman, F.W.Jr., Cleveland, P.D., Law, N.C. and Sunderman, F.W.: A method for the determination of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid (VMA) for the diagnosis of pheochromocytoma. *Amer. J. Clin. Path.*, 34:293-312, 1960.
- 46) Suzuki, T. and Ozaki, T.: A method of the colorimetric determination of noradrenaline and adrenaline by employing the permanganate reagent. *Tohoku J. Exper. Med.*, 54:332, 1951.
- 47) Vulpian, A.: Note sur quelques réactions à la substance des capsules surrénales. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 43:663, 1856.
- 48) Weil-Malherbe, H. and Bone, A.D.: The chemical estimation of adrenalinelike substances in blood. *Biochem. J.*, 51:311-318, 1952.
- 49) West, G.B.: The estimation of adrenaline in normal rabbit's blood. *J. Physiol.*, 106:426-430, 1947.
- 50) Whitehorn, J.C.: A chemical method for estimating epinephrine in blood. *J. Biol. Chem.* 108:633-643, 1935.
-