

高性能陰イオン交換クロマトグラフィーによる 尿中紫外吸収物質の分析法

松 下 駿
多 田 芳 光
生 重 哲 男

Analysis of the Ultraviolet-Absorbing Constituents of Urine by High Performance Anion Exchange Chromatography

Susumu MATSUSHITA
Yoshimitsu TADA
Tetsuo IKUSHIGE

A high performance liquid chromatograph has been used to separate ultraviolet-absorbing constituents of human urine. A 40 μ l urine sample was chromatographed on a 0.75 \times 30 cm column packed with a 4–6 μ DEAE-20000 SW gel. More than ninety ultraviolet absorbing constituents from urine were successfully separated in less than 90 min by eluting stepwise with acetate buffer at a flow rate of 1 ml/min and a pressure of 40–80 kg/cm². The column was maintained at ambient temperature. The effluent was monitored by ultraviolet, voltammetry, and fluorescence detections. Utilizing this system, the qualitative determinations have been made for the biologically important components such as nucleic acids, organic acids, and coenzymes.

1. はじめに

尿中には多種多様の物質が含まれており、これらの物質は種々の病的動態と相関のあることが示されており、臨床的見地から血液に次いで有用である¹⁾²⁾。そこで、尿成分の迅速かつ再現性の良い分析法があれば、医学的な診断や治療および投与薬物の代謝の研究などの応用が考えられ、ひいては生物代謝の研究に必須の手段となるはずである³⁾⁴⁾。

C. D. Scott 等は、陰イオン交換クロマトグラフィーによって尿中紫外吸収物質を約4時間で分析する方法を開発した⁵⁾。この分析法の利点は、多成分を同時に分離分析できる点にあり、この手法の改良が瀬田等⁶⁾⁷⁾によって行なわれている。著者等は、G 2000 SW を母体構造とする極めて硬い陰イオン交換ゲルを用いて、尿成分の分離方法を検討した。

さらに、核酸構成成分や有機酸の検討も行い、生体物質の迅速分離分析法としての有用性を認めた。

2. 試薬および装置

[1] 試薬

正常および異常域コントロール尿は、Bio-Reagents & Diagnostics 社製を使用した。

緩衝液を調製した種々の塩は、市販特級品を使用し、尿酸や馬尿酸等の尿中紫外吸収物質は、市販品をそのまま使用した。

[2] 装置

高速液体クロマトグラフと付属装置は、すべて東洋曹達製のものを使用し、検出器は、UV 254 nm 固定波長検出器を主に使用し、UV-可視波長可変検出器、電気化学検出器 (EC-8 型)、ケイ光検出器 (SF-970) も適宜使用した。

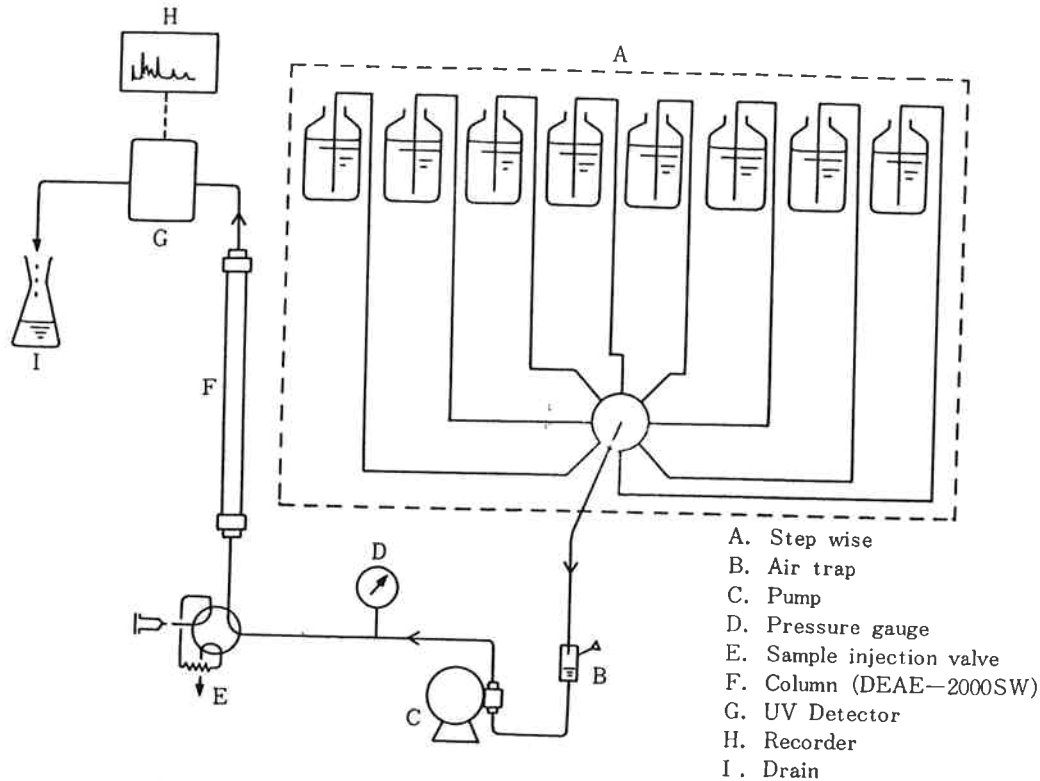


Fig. 1 High performance anion exchange chromatograph for the UV-absorbing constituents of body fluids

以上の装置の流路系を Fig. 1 に示した。

[3] 充てん剤

東洋曹達製充てん剤 G 2000 SW にジェチルアミルエチル基 (DEAE) を導入した陰イオン交換ゲル (DEAE-2000 SW) であり、主に $(5 \pm 1) \mu\text{m}$ の粒径で交換容量 0.63 meq/g のものを使用した。

3. 実 験

[1] カラムの調製

内径 7.5 mm 、長さ 30 cm のステンレス製クロマト管にスラリー法で DEAE-2000 SW を充てんした。

[2] 試料の調製

主としてコントロール尿を使用し、人尿については、既報⁹⁾に従って調製した。固形分は、 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターで除去し、その後クロマトグラフィーに供試した。

[3] 高速イオン交換クロマトグラフィー

$6 \times 10^{-4} \text{ M}$ の緩衝液でカラムを平衡化したのち、試料尿 $40 \mu\text{l}$ をサンプリングバルブを用いて注入し、同時にステップワイズ型濃度公配装置を始動する。カラム温度が常温では、流速 1 ml/min で、圧力は、 40 kg/cm^2 から徐々に上昇し、最終濃度 6 M では、 80 kg/cm^2 に達する。分析終了後、再び $6 \times 10^{-4} \text{ M}$ の緩衝液に戻し、再度分析できるまで30分間待機する。

4. 結果と考察

[1] 標準法の設定

正常域コントロール尿のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。このクロマトグラム上では、尿中紫外吸収物質が96成分存在し、90 min 以内に分析が完了した。

クロマトグラム上のピークの同定は、28種の標準物質を注入し、その保持容量から求めた。

Fig. 2 のクロマトグラム上の10分前後のピーク群は、クレアチン、クレアチニン、ヒスチジン、ウラシルなどの塩基性物質、30分以上のピーク群は、芳香族カルボン酸を主体とする酸性物質であることを認めた。

Fig. 2 において、32分からベースラインが上昇しているのは、酢酸緩衝液の濃度上昇によるものである。

同一試料を11回注入し、主な10本のピークについて、それぞれの溶出時間とピーク高さについて変動係数を求めたところ、それぞれ $\pm 3.5\%$ と $\pm 2.3\%$ であり、これらの値からこの分析方法は、再現性のよい方法であることを確認した。

[2] 移動相組成の検討

Fig. 2 の標準分析法において pH 4.4 の酢酸緩衝液を使用しているが、pH を変化させた場合の分離への影響を検討した。

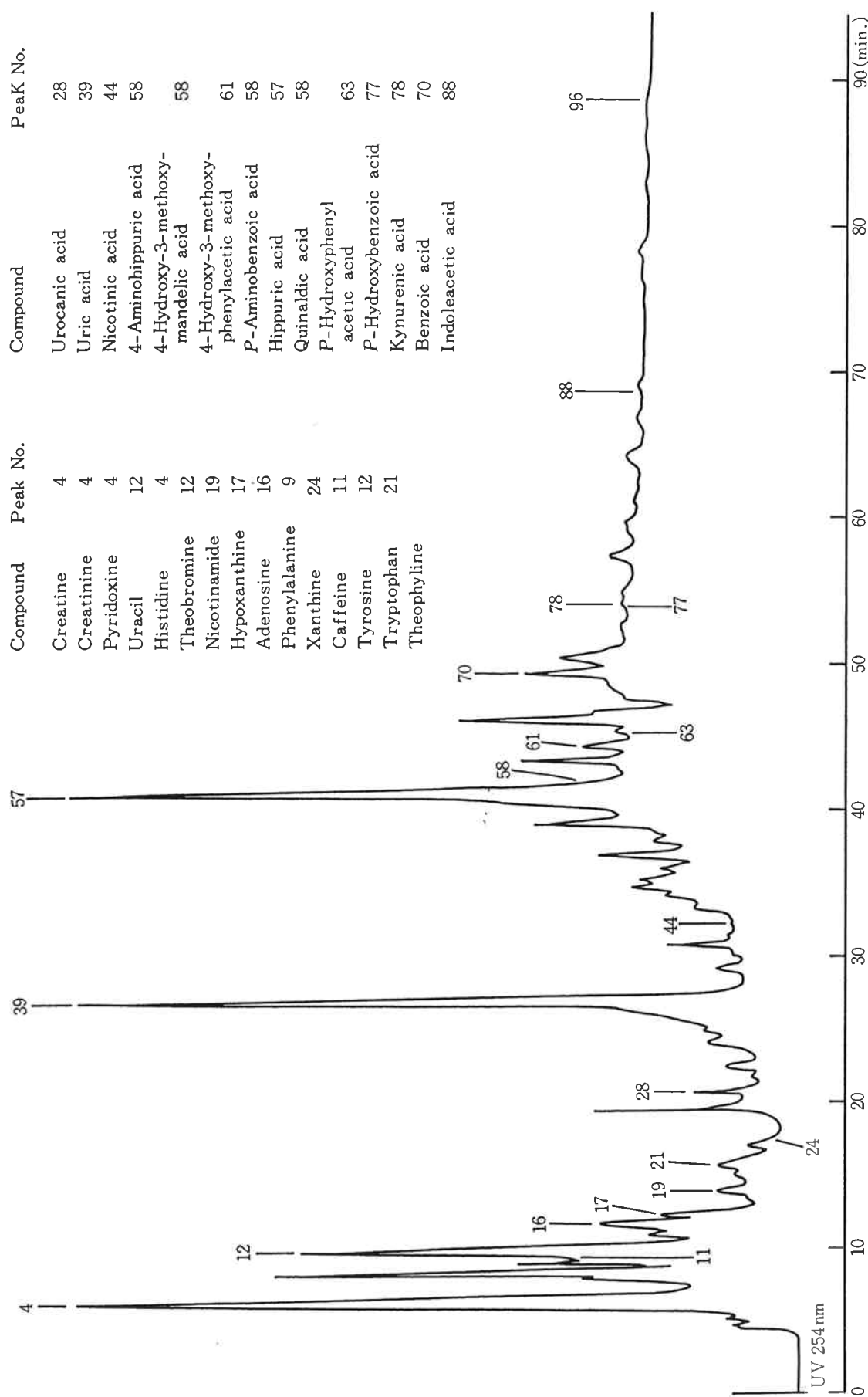


Fig. 2 Typical 90 minutes chromatogram of human urine Run conditions column: 30×0.75 cm i.d., packed with TSK-GEL DEAE-2000SW; urine sample: 40 μl of a normal control urine-human (BIO-REAGENTS & DIAGNOSTICS, INC.); temperature: ambient temperature; eluent: ammonium acetate buffer, pH 4.4, varying concentration from 0.0006M to 6.0M by stepwise; detector: UV 254 nm

1 M 酢酸アンモニウムを用いて pH 3, 4, 5, 6, 7 の各緩衝液を調整し、標準品にウラシル、尿酸、馬尿酸、安息香酸、3-インドール酢酸を用いて得た結果を Fig. 3 に示す。酢酸緩衝液を用いた時、pH 4~5 の間で迅速で良い分離が得られた。

酢酸緩衝液は、濃度が上昇するにつれて UV 254 nm に吸収が現われ、それにつれてベースラインが上昇するので、UV 254 nm に吸収のない緩衝液、例えば、リン酸緩衝液 (pH 3~7) について検討したが、3-インドール酢酸の吸着が生じ、pH 2.5 では溶出に 131 分もかかった。

さらに、リン酸緩衝液に塩化カリウムを 0.1~1 M 共存させて溶離時間の短縮を検討したが、3-インドール酢酸を 100 分以内に溶出さすことはできなかった。

一方、水溶性の有機溶媒、例えば、アセトニトリルをリン酸緩衝液に溶解混合した移動相では、pH を下げると 3-インドール酢酸の溶出は早くなるが、逆に、塩基性物質の分離が極めて悪くなる。

0.2M リン酸緩衝液 (pH 6.98) とアセトニトリルが5 :

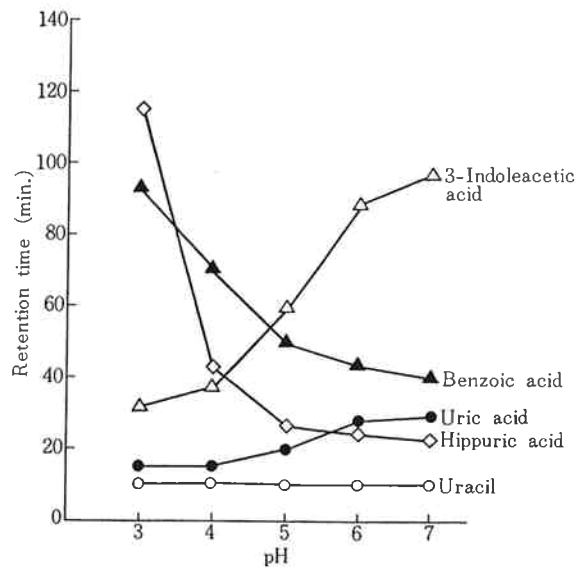


Fig. 3 Effect of pH of acetate buffer on the separation of the ultraviolet-absorbing constituents of human urine

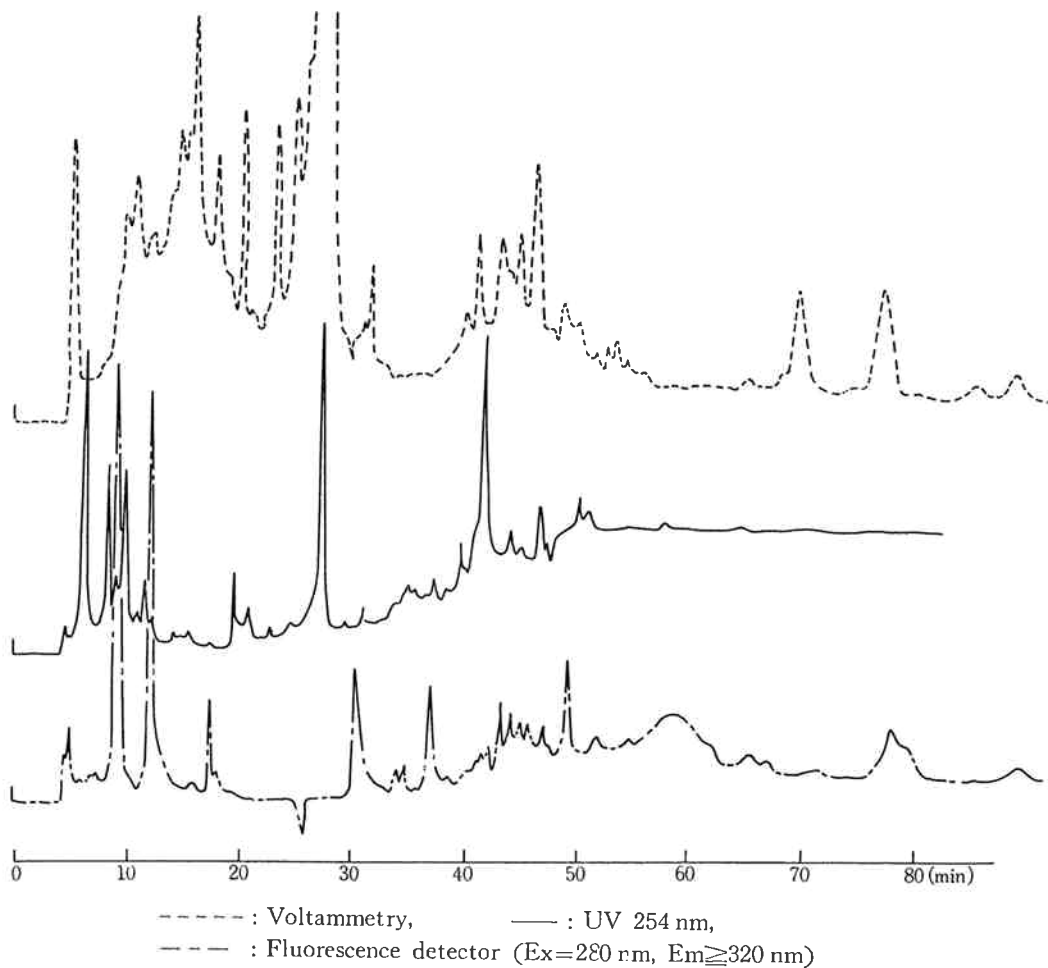


Fig. 4 Comparative chromatograms of human urine
Run conditions are the same as listed in Fig. 2

2の混合溶液を移動相とした正常域コントロール尿のクロマトグラムは、75分以内で分析できるが、30成分のピークが認められるにすぎなかった。

[3] 検出器の検討

標準分析法においては、UV 254 nm 固定波長を使用しているが、尿成分中には、UV 254 nm では検出されないが、あるいは検出されても感度が低い物質が存在するため、さらに高感度、あるいは選択的な検出器の検討が必要である。

Fig. 4 に、電気化学検出器と紫外線検出器 (UV 254 nm)、およびケイ光検出器を用い、同一条件で測定したクロマトグラムを示す。

電気化学検出器は、Kissinger⁸⁾ 等によって、HPLC 用検出器として開発され、酸化性物質あるいは還元性物質を参照電極の電位を基準に作用電極と補助電極の間で定電位電解を行い、電解電流を測定することによって行うものである。

Fig. 4 においては、設定加電圧 +0.8V 対 Ag/AgCl

- | | |
|-----------------|------------|
| 1. Cytosine | 16. 5' UMP |
| 2. Cytidine | 17. 5' IMP |
| 3. Thymidine | 18. 2' UMP |
| 4. Uridine | 19. 5' AMP |
| 5. Inosine | 20. 5' ADP |
| 6. Uracil | 21. 3' AMP |
| 7. Thymine | 22. 2' GMP |
| 8. Adenosine | 23. 5' GMP |
| 9. Hypoxanthine | 24. 5' IDP |
| 10. Guanosine | 25. 5' ITP |
| 11. Adenine | 26. 5' UDP |
| 12. Guanine | 27. 5' CTP |
| 13. 5' CMP | 28. 5' ATP |
| 14. 2' CMP | 29. 5' GDP |
| 15. 5' TMP | |

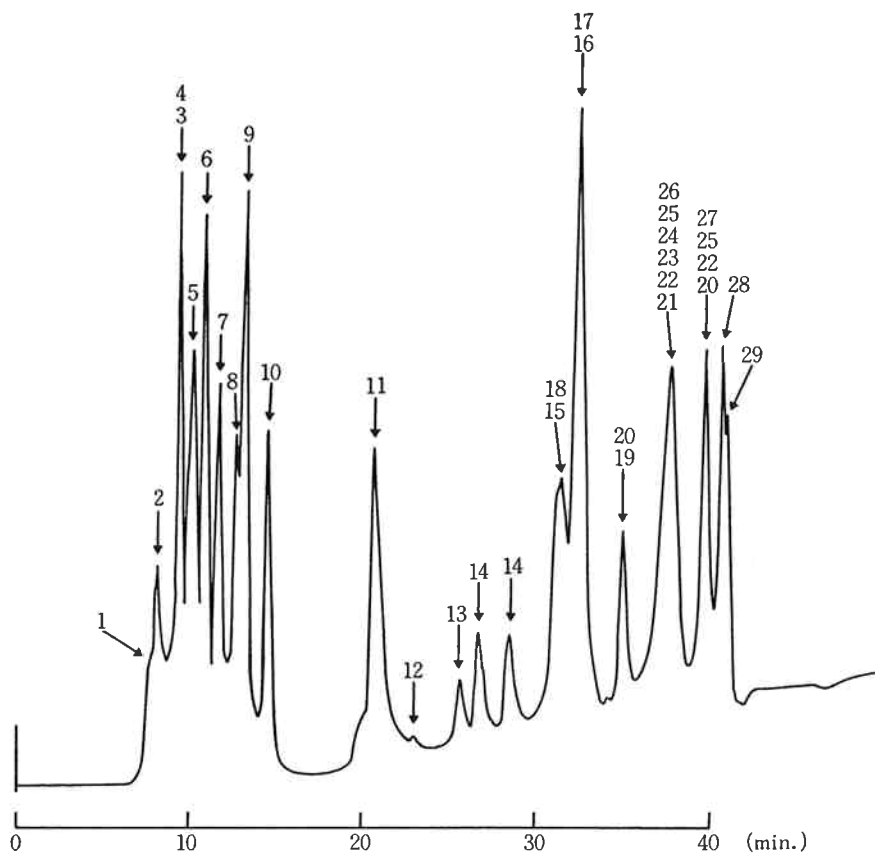


Fig. 5 Chromatogram of an authentic mixture of nucleic acid components Run conditions are the same as listed in Fig. 2

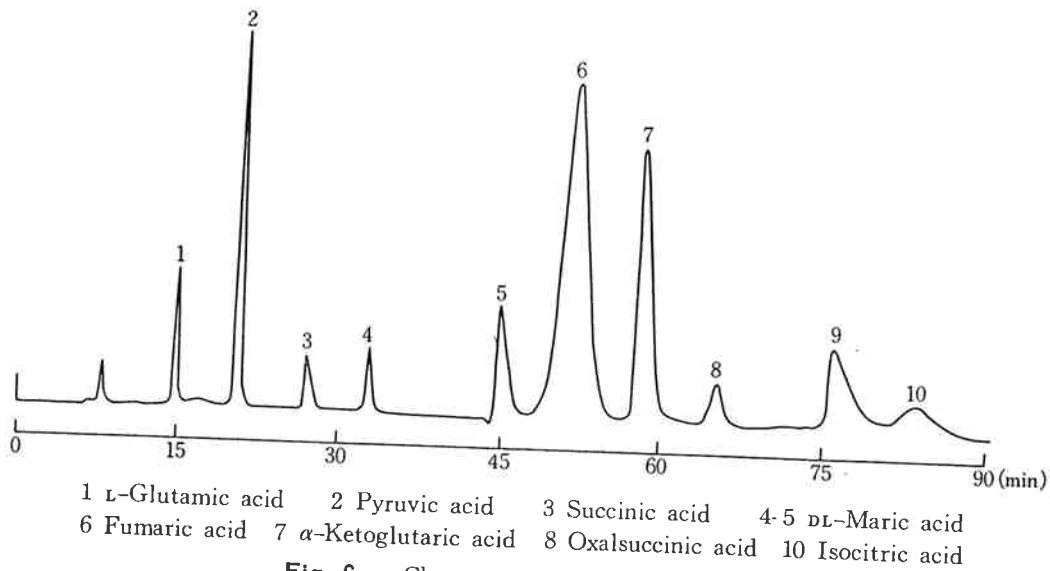


Fig. 6 Chromatogram of organic acids

において、尿酸のピークは、完全にオーバースケールしており、この条件では、フェノール様物質が高感度に検出されていると推定された。

一方、ケイ光検出器は紫外線によって励起され、特定の溶質から放出されるケイ光エネルギーを測定するので感度が高く選択性がある。

Fig. 4 の条件は、励起波長 280 nm、ケイ光波長 320 nm 以上であり、インドール骨格をもつトリプトファン代謝物が検出されていると思われる。

〔4〕 各種生体構成成分の分離

生体構成成分は大きく脂質、蛋白、糖、核酸の4種より成り立っており、脂質を除く3種は、高速陰イオン交換クロマトグラフィーに適用可能である。

ここでは、核酸構成成分、有機酸、補酵素の応用例について紹介する。

(1) 核酸構成成分

尿中に存在する核酸構成成分は、高分子ではなく、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基などであり、UV 254 nm で検出できる。

Fig. 2 と同様の条件下で得られた核酸構成成分のクロマトグラムを Fig. 5 に示す。

一方、赤血球中には、ADP や ATP が含まれており、血球の鮮度や病態時の異常などの研究に有効であると考えられている。

(2) 有機酸

人尿中には、種々の有機酸が存在しており、Fig. 2 においては、インドール骨格をもつ有機酸が UV 254 nm で検出されている。

Fig. 6 に TCA サイクルの代表的な有機酸のクロマトグラムを示す。クロマト条件は、移動相に 0.2 M

KH_2PO_4 (pH 4.49)/アセトニトリル(7/3)を用いたため、UV 210nm で有機酸のカルボニル基を直接検出することができた。

(3) 母乳および市販粉ミルク

母乳および市販粉ミルクの固形分の中の主成分は、脂肪47~51%、蛋白質7~20%、炭水化物30~42%と微量のビタミンとミネラルが含まれている。

Fig. 7 に母乳および市販粉ミルクの比較クロマトグラムを示す。クロマトグラムにおいて紫外吸収ピークは、

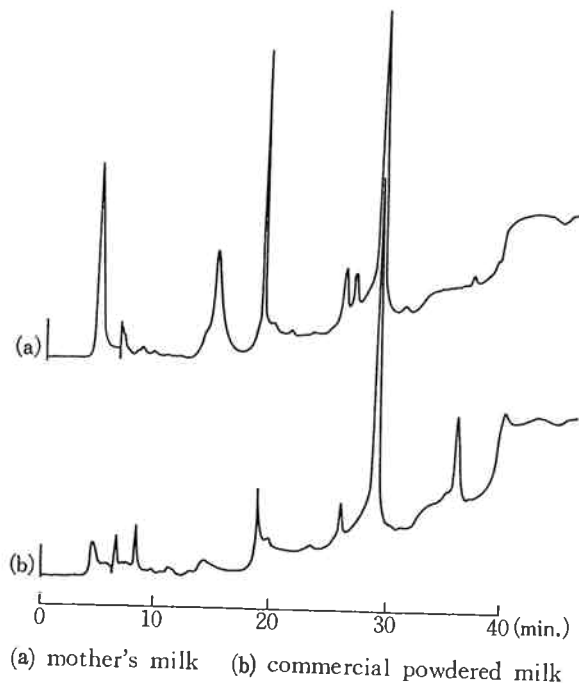


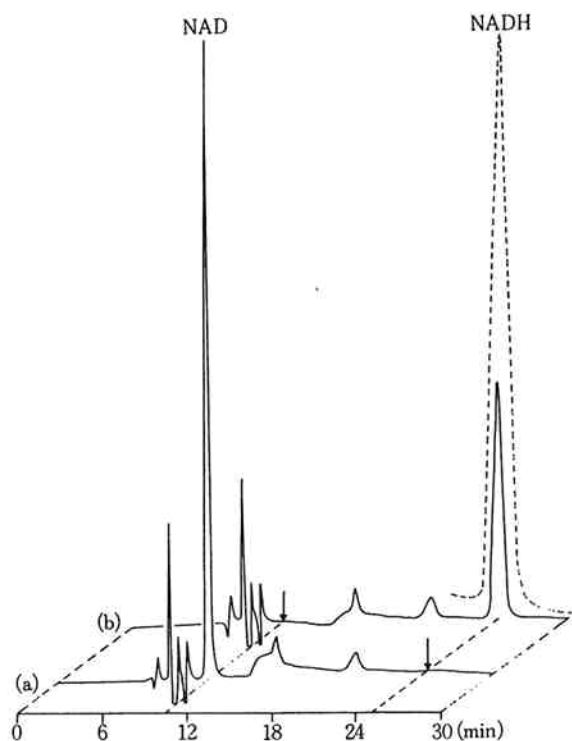
Fig. 7 Comparative chromatograms of the UV-absorbing constituents of milk
Run conditions are the same as listed in Fig. 2

ビタミン類と思われ、母乳と市販粉ミルクのクロマトグラムの違いは明らかである。

(4) 補酵素

補酵素は、酵素反応で重要な役割を演じており、NAD および NADH を正確かつ迅速に分析することができれば、酵素反応の研究に役立つと思われる。

Fig. 8 にアルコール脱水素酵素 (ADH) の応用例を示す。



(a) a mixture NAD and ethylalcohol (b) a mixture of NAD, ethylalcohol and alcohol dehydrogenase (ADH) was injected after 2 minutes
 — : UV 254 nm, - - - - : Voltammetry

Fig. 8 Comparative chromatograms for enzyme reaction

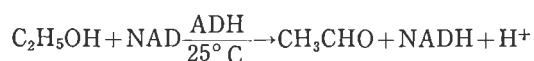


Fig. 8 の試料の調製は以下の通りである。

(a) :	{	0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.7)	2.5 ml
		エタノール	125 μl
		0.5 M Na-EDTA (pH 8.7)	5 μl
		0.01 M NAD	20 μl

(b) : (a) + 3 mg ADH を 0.02 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.1) 1 ml に溶解し、その 10 μl と混合。

クロマトグラフには(a)および(b)の各 20 μl を注入した。なお、Fig. 8 において、移動相は 0.2 M KH₂PO₄(pH 6.98)/アセトニトリル (7/3) を用いており、微量の NADH は、電気化学検出器によって検出できることがわかる。

5. 結 語

以上のように硬質陰イオン交換ゲルを用いる高速液体クロマトグラフィーによって尿成分を中心とする各種生体成分の分離分析が可能であることが判明した。このことは、アミノ酸分析計を始めとする反応型 HLC や特定成分のみを簡便かつ、迅速に分析できる簡易型 HLC への進展を支持するものと思われる。

今後、新しい検出手段が開発されるとピークの同定が容易となり、さらに、データ処理システムとの接続によって生体成分の代謝経路が定量的に解明されることになれば、高速陰イオン交換クロマトグラフを中心とするシステムは、生化学分野において、必須の武器になるものと思われた。

文 献

- 1) A. White, P. Handler, E. L. Smith; *Principles of Biochemistry*, 4th Ed., McGraw Hill New York, 342.
- 2) L. Pauling; *Science*, **160**, 268 (1968).
- 3) 奥山典生, 瀬田 和; 化学の領域, 増刊 109 号 “高速液体クロマトグラフィー”, 南江堂, 137.
- 4) K. S. Warren, C. D. Scott; *Clin. Chem.*, **15**, 1147 (1969).
- 5) C. D. Scott, J. E. Attil, N. G. Anderson; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **125**, 181 (1967).
- 6) 瀬田和夫, 和志武三徳, 安茂寿夫, 高井信治, 奥山典生; “分析化学”, **27**, 73 (1978).
- 7) 瀬田和夫, 和志武三徳, 安茂寿夫, 高井信治, 奥山典生; “分析化学”, **28**, 179 (1979).