

Title	ヒト尿中紫外部吸収物質の高速液体クロマトグラフィー. 多孔質ガラスODSカラムとシリカODSカラムの比較
Sub Title	Analysis of ultraviolet absorbing compounds in human urine by high-performance liquid chromatography using columns of octadecylsilyl-porous glass and ODS-silica.
Author	永田, 佳子(Nagata, Yoshiko) 金, 裕姫(Kim, Yuhi) 仲道, 靖子(Nakamichi, Yasuko) 松島, 美一(Matsushima, Yoshikazu) 高井, 信治(Takai, Nobuharu)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1989
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.34 (1989.) ,p.39- 45
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	原報
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000034-0039

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

ヒト尿中紫外吸収物質の高速液体クロマトグラフィー。 多孔質ガラス ODS カラムとシリカ ODS カラムの比較

永田佳子, 金 裕姫, 仲道靖子, 松島美一, 高井信治*

Analysis of Ultraviolet Absorbing Compounds in Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography Using Columns of Octadecylsilyl-porous glass and ODS-silica.

Yoshiko NAGATA, Yuhi KIM, Yasuko NAKAMICHI,
Yoshikazu MATSUSHIMA and Nobuharu TAKAI*

Columns of octadecylsilyl-porous glass (MPG-ODS) and octadecylsilylsilica (ODS-silica) were used for the high-performance liquid chromatographic analysis of ultraviolet-absorbing compounds in human urine. The samples were eluted with linear gradient of phosphate buffer (pH 2.12) to a 1:1 mixture of the buffer and acetonitrile. The chromatograms by ODS-silica attained better separation of the peaks than those by MPG-ODS. It is concluded that the column of MPG-ODS with a pore size of 550 Å is suited for the rapid analysis of the compounds with larger molecular sizes than the compounds of the present purpose.

[緒言]

尿や血液をはじめとする生体液中には数千もの物質が含まれており、これらを正確に分析することにより、多くの重要な生体情報を得ることができる。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) はこれら生体からの情報を得る手段として繁用されている。特定の目的成分の分析に限らず未知成分を含めたかたちで生体液を HPLC 分析し、そのクロマトグラムのパターン変化を臨床診断に応用する多成分同時迅速分析法の開発が進められて、すでに若干の報告がある¹⁾。われわれもヒト尿の多成分同時迅速分析をいくつかのカラムを用いて検討してきた。イオン交換系の CDR-10 (4 mm ID × 250 mm, 三菱化成工業), 逆相系のシリカ ODS の TSKgel ODS-120A (4.6 mm ID × 250 mm, 東ソー) カラムを用いた実験の結果はすでに報告した²⁾。シリカ ODS は生体液を未処理で用いると短期間にカラム性能が劣化し、アルカリ性溶離液の使用も不可能であるという欠点がある。

われわれは HPLC による分析の高速化を目的としてカラム充填剤の開発を行い、オクタデシルシリル化した多孔質ガラス (MPG-ODS) が優れた特性を示すことを見いだした。このカラムにより解熱剤³⁾, 免疫抑制剤⁴⁾ の迅速分析が可能となった。この技術は超高速液体クロマトグラフィーともよばれている^{4,5)}。われわれはこの技術の生薬成分への応用についても検討し、薬用人参や柴胡の主要成分の分析で良い結果を得た⁶⁾。多孔質ガラスはケイ酸系材料である為、耐化学性、耐熱性に優れており、機械的強度も比較的強い。このことから生体液分析により流路や

* 東京大学生産技術研究所

フィルター、カラム先端部や充填剤へのタンパク質その他の成分の吸着が生じた場合、アルカリや酸溶液による洗浄が可能と考えられる。

今回、充填剤ガラス ODS (MPG-ODS) を用いた HPLC による尿成分の分析を試み、最適分析条件を検討した。また、従来使用のシリカ ODS カラム (TSKgel ODS-120 A) を用いた場合との比較を行った。以下にその結果を記す。

[実 験]

装 置：送液ユニット LC-6A 型ポンプ 2 台を使用しシステムコントローラ SCL-6A でグラジェント制御した。検出は、紫外分光光度計 SPD-6A (UV 254 nm) を用いた。データはクロマトパック CR-3A を接続し処理した。

カラム：シリカ ODS の TSKgel ODS-120A (4.6 mm ID×250 mm)

ガラス ODS の MPG-ODS (4.0 mm ID×150 mm) および MPG-ODS (4.0 mm ID×150 mm×2) を用いた。MPG-ODS はガラス孔径 550 Å、粒子径 10 μm の伊勢化学工業製品を用いた。カラム温度は室温とした。

溶離液：以下に示す A 液より B 液の linear gradient で溶離した。

A : 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M KH₂PO₄ buffer (pH 2.12)

B : 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M KH₂PO₄ buffer (pH 2.12) : CH₃CN = 1 : 1

試 料：健康なヒトの尿を採取し、0.45 μm のメンブランフィルターで濾過し、-20°C で凍結保存した。分析直前に 37°C で解凍し、サンプルフィルター (0.4~0.7 μm, 梅谷精機) にて濾過した。この試料 25 μl を HPLC に注入した。

試 薬：特級 KH₂PO₄, 特級 H₃PO₄, 液体クロマトグラフ用蒸留水, 液体クロマトグラフ用 CH₃CN は和光純薬から購入した。

[結果・考察]

A 液を 0.1 M KH₂PO₄ buffer (pH 2.12), B 液を 0.1 M KH₂PO₄ buffer (pH 2.12) : CH₃CN = 1 : 1 とし、これらの溶離液により Table I に示したグラジェント条件で尿試料を TSKgel ODS-120A カラムと MPG-ODS カラムで溶離した。そのクロマトグラムを Fig. 1-a, b に示した。MPG-ODS カラム 2 本をつなげ、カラム長さを 30 cm として分析したクロマトグラムを Fig. 1-c に示した。Fig. 1-a, b に示した A, B, C のピークは標準品とのリテンションタイムの一致からそれぞれクレアチニン, 尿酸, 馬尿酸であると推定できる。

Table I [Fig. 1 のグラジェント条件]

time (min)	A %	B % (CH ₃ CN %)
0	100	0 (0)
60	0	100 (50)
80	0	100 (50)
85	100	0 (0)

flow-rate = 0.8 ml/min

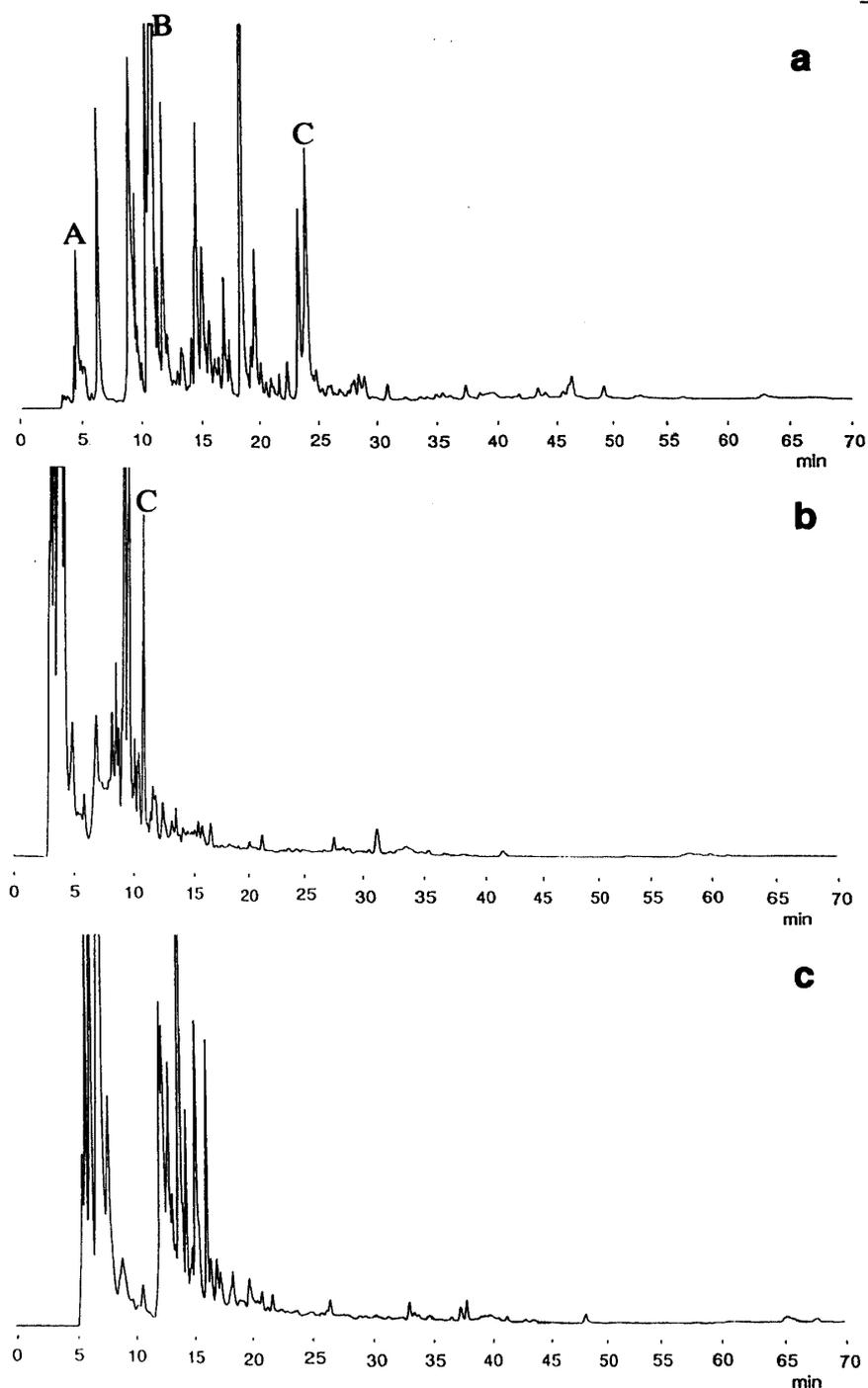


Fig. 1 Chromatograms of human urine with the gradient of 0.1 M KH_2PO_4 (pH 2.12) to a 1:1 mixture of 0.1 M KH_2PO_4 (pH 2.12) and acetonitrile using the columns of (a) TSKgel ODS-120A (4.6 mm ID \times 250 mm), (b) MPG-ODS (4.0 mm ID \times 150 mm) and (c) MPG-ODS (4.0 mm ID \times 150 mm \times 2) with a flow-rate of 0.8 ml/min.

Fig. 1-a, b, c のクロマトグラムは TSKgel ODS-120A カラムが 15 cm, 30 cm の各 MPG-ODS カラムよりも検出ピーク数も多く分離能も優れていることをしめしている。MPG-ODS では全体に成分ピークの溶出が早く特に尿酸ピーク以前のピークはほぼ一度に溶出され、短時間にほとんど

のピークの溶出は終了した。またピークの重なりが多く検出ピーク数も少なかった。既報⁶⁾より MPG-ODS は同一試料をシリカ ODS に比べ溶離液組成の有機溶媒含量の少ない組成で溶離する

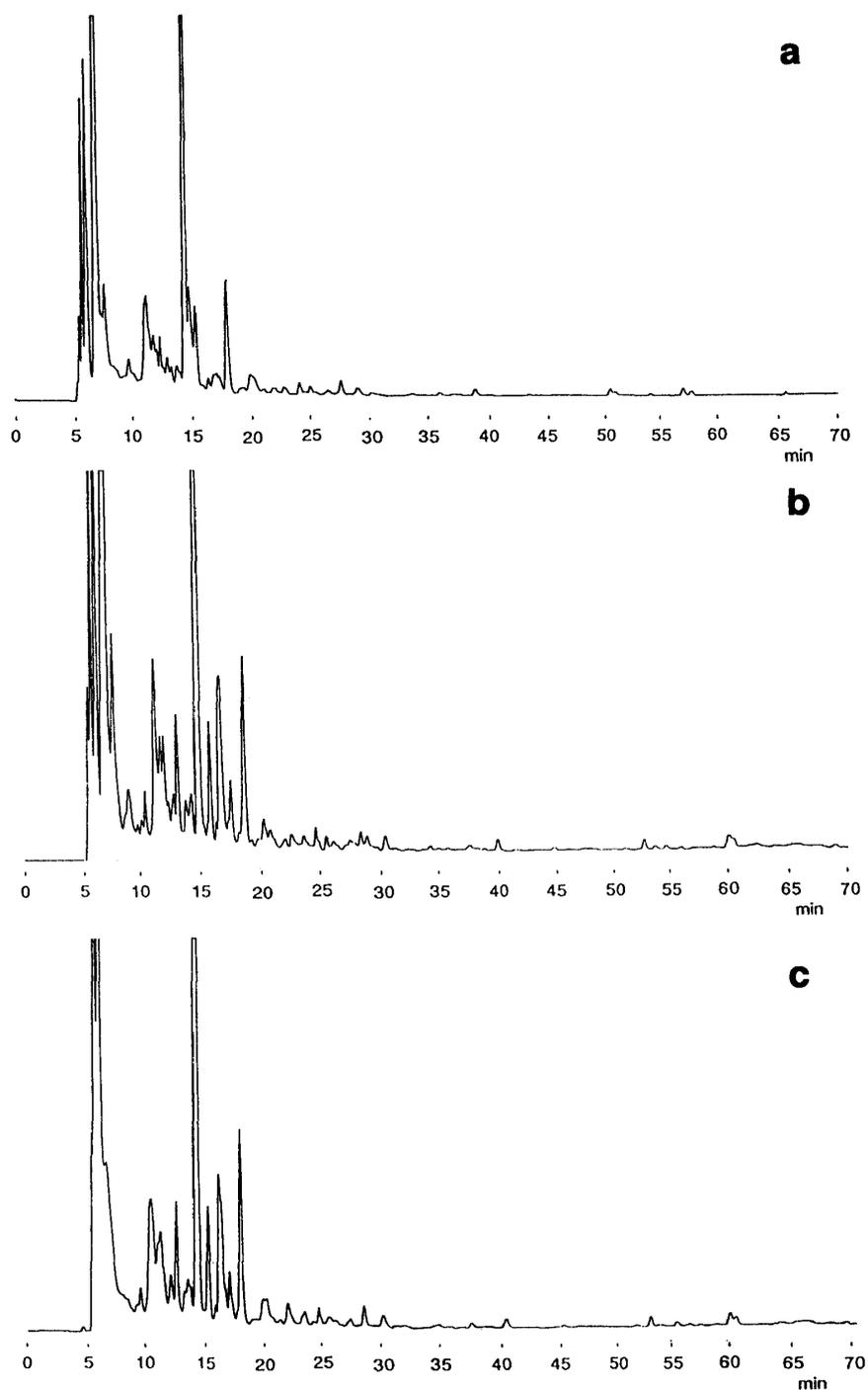


Fig. 2 Chromatograms of human urine using the columns of MPG-ODS (4.0 mm ID×150 mm×2) with a flow-rate of 0.8 ml/min with the gradients of (a) 0.05 M KH_2PO_4 (pH 2.12) to a 1:1 mixture of 0.05 M KH_2PO_4 (pH 2.12) and acetonitrile, (b) 0.1 M KH_2PO_4 (pH 2.12) to a 1:1 mixture of 0.1 M KH_2PO_4 (pH 2.12) and acetonitrile and (c) 0.2 M KH_2PO_4 (pH 2.12) to a 1:1 mixture of 0.2 M KH_2PO_4 (pH 2.12) and acetonitrile.

Table II [Fig. 2 のグラジエント条件]

time (min)	A %	B % (CH ₃ CN %)
0	100	0 (0)
60	50	50 (25)
80	50	50 (25)
85	100	0 (0)

flow-rate = 0.8 ml/min

Table III [Fig. 4 のグラジエント条件]

time (min)	A %	B % (CH ₃ CN %)
0	100	0 (0)
60	50	50 (25)
80	50	50 (25)
85	100	0 (0)

flow-rate = 0.4 ml/min

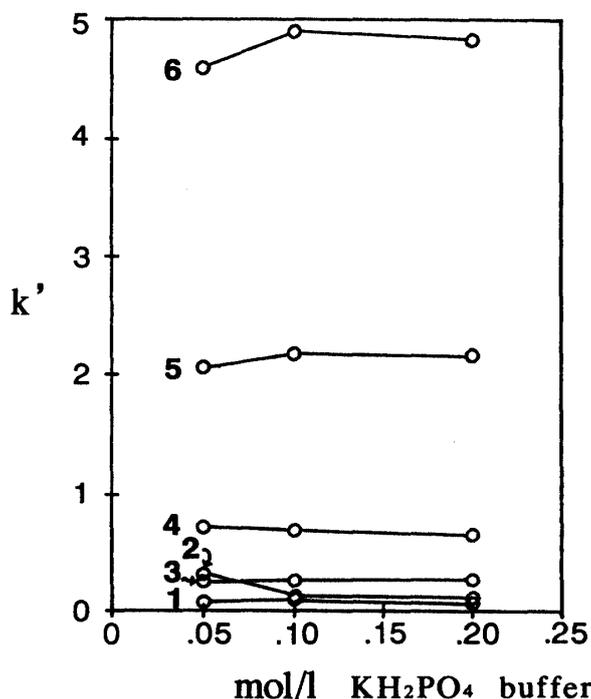


Fig. 3 A plot of the concentration of phosphate buffer in the mobile phases against the k' value for 1, ascorbic acid; 2, creatinine; 3, uric acid; 4, p-aminobenzoic acid; 5, hippuric acid; 6, indoleacetic acid.

という特性が明かとなっている。このことよりガラス ODS カラムを用いての分析にはシリカ ODS の場合とは異なる溶離液組成及びグラジエント条件が必要と考えられる。以下 MPG-ODS カラム (4 mm ID×150 mm×2) を用い溶離液組成, グラジエント条件と流速の尿成分分離への影響について検討を行った。

Table II に示したグラジエント条件で溶離液の KH₂PO₄ buffer (pH 2.12) の濃度を 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M と変えた場合の尿試料のクロマトグラムを Fig. 2-a, b, c に示した。3 種の溶離液のうち 0.1 M が最も良好な分離を示した。個々のピークの溶出挙動を尿のクロマトグラムから知るのには困難であるため、6 種 (1, アスコルビン酸; 2, クレアチニン; 3, 尿酸; 4, p-アミノ安息香酸; 5, 馬尿酸; 6, インドール酢酸) の標準品を上記 3 種の濃度の溶離液を用い同条件下で HPLC に注入し, その保持時間 (t_R) から k' 値を式 $k' = (t_R - t_0) / t_0$ により算出した。 k' 値を溶離液濃度に対しプロットし, Fig. 3 に示した。0.1 M, 0.2 M の溶離液では各成分とも k' 値

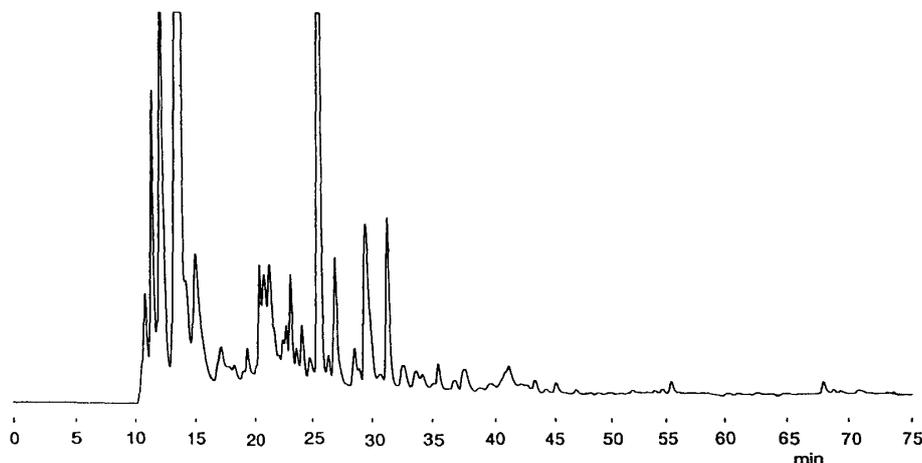


Fig. 4 A chromatogram of human urine using the columns of MPG-ODS (4.0 mm ID×150 mm×2) with a flow-rate of 0.4 ml/min with the gradient of 0.1 M KH_2PO_4 (pH 2.12) to a 1:1 mixture of 0.1 M KH_2PO_4 (pH 2.12) and acetonitrile.

に大きな差はなかった。しかし 0.05 M の場合クレアチニンと尿酸の k' 値が逆転し、保持時間の遅い馬尿酸、インドール酢酸は 0.1 M, 0.2 M の場合と比べ k' 値が小さくなった。

0.1 M KH_2PO_4 buffer (pH 2.12)/0.1 M KH_2PO_4 buffer (pH 2.12) : CH_3CN = 1 : 1 の溶離液を用い、さらに良好な分離を得るためにグラジエント条件の検討を行った。Table I, II に示したグラジエント条件で得られたクロマトグラムを Fig. 1-c, 2-b に示した。グラジエントの傾きの小さい Fig. 2-b のクロマトグラムの方が各ピークの溶出時間が遅くなり重なっていたピークの見分けが認められた。

流速の相違が分離に与える影響を上記と同様の 0.1 M KH_2PO_4 buffer (pH 2.12)/0.1 M KH_2PO_4 buffer (pH 2.12) : CH_3CN = 1 : 1 の溶離液を用い、Table II, III に示したグラジエント条件を用いて検討を行った。流速 0.8 ml/min のクロマトグラムを Fig. 2-b に、流速 0.4 ml/min のクロマトグラムを Fig. 4 に示した。流速の遅い方がピーク間隔が広がり重なって速い流速では検出不可能であった小さなピークの存在が確認された。しかし、全体にピーク幅が広がり顕著な成分分離の改善は認められなかった。

[結 論]

ホウケイ酸ガラスを基材とした逆相ガラス ODS カラムの尿の多成分分析への応用の可能性を検討するため、その最適溶離条件を求め従来使用のシリカ ODS カラム (本実験系においては TSKgel ODS-120A を使用) との比較を行った。その結果ガラス ODS はシリカ ODS 程は良好な分離が得られなかった。これは分析対象の尿成分が低分子物質がほとんどであるのに対し、ガラス ODS (MPG-ODS) は孔径が 550 Å と TSKgel ODS-120A の 120 Å よりかなり大きいため尿成分分子の大きさと細孔径の大きさが適当ではなかったためと考えられる。また、ガラス ODS の平均粒子径が 10 μm に対し、TSKgel ODS-120A は 5 μm と充填剤の粒子径が異なる事もその原因として考えられる。将来、さらに粒子径が 10 μm 以下で細孔径が 100 Å 前後のガラ

ス ODS が製造されれば尿成分分析に応用可能と考えられるが、現段階では尿成分同時分析にはシリカ ODS カラムの方が適しているという結論に達した。

謝 辞

本研究の一部は文部省科学研究費補助金、日本私学振興財団学術研究振興資金および公益信託荒木医学生化学研究振興基金助成金により支えられた。また、MPG-ODS は伊勢化学工業株式会社より提供を受けた。感謝する。

参考文献

- 1) a) 高井信治; 精密機械, 48, 562 (1982); b) 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); c) H. Miyagi, J. Miura, Y. Takata, S. Kamitake, S. Ganno and Y. Yamada, J. Chromatogr., 239, 733 (1982); d) N. Yamada, T. Okubo, Y. Sakurai, N. Takai, T. Muroya, Y. Tenjin, H. Nakamura; J. Life Support Tecnology Society, 2 (3), 268 (1988); e) 山田則子, 安田千穂, 桜井靖久, 高井信治; J. Life Support Tecnology Society, 2 (3), 317 (1988)
- 2) a) Y. Nagata, Y. Yokoyama, S. Nagura, S. Sugata, T. Fujie, Y. Matsushima and N. Takai; J. Llq. Chromatogr., 10 (13), 2993 (1987); b) 永田佳子, 内田雅子, 小柳雅美, 松島美一, 高井信治, 海野益郎; J. Life Support Tecnology Society, 1 (2), 86 (1986)
- 3) Y. Matsushima, Y. Nagata, K. Takakusagi, M. Niyomura and N. Takai, J. Chromatogr., 332, 265 (1985)
- 4) 高井信治, 松島美一, 大坪修, 葛原敬八郎, 柳沢孝嘉, 山田豊; 生産研究, 41, 179 (1989)
- 5) 山辺武郎 編著; 「超高速液体クロマトグラフィー」産業図書, 東京, 1989
- 6) a) H. Kanazawa, Y. Nagata, Y. Matsushima, M. Tomoda and N. Takai; Chromatographia, 24, 517 (1987); b) 金沢秀子, 永田佳子, 松島美一, 友田正司, 高井信治, 生薬学雑誌; 43, 121 (1989); c) 高井信治, 金沢秀子, 松島美一, 永田佳子, 友田正司; 生産研究, 41 (1989); d) 金沢秀子; 共立薬科大学修士論文「薬用人参成分の高速液体クロマトグラフィー」31 (1988)