同様に 3,5-ジニトロフェニルイソシアネートを用い尿素誘導体として分離を試みたところ、固定相 [I] では分離係数 1.18 (移動相 B)、固定相 [II] では分離係数 1.52 (移動相 E) を得た。この結果は二級アミンの光学異性体において尿素誘導体として分離する方法が有効なことを示唆する。

以上のような光学活性固定相を用いる分離法は、生理活性を異にするアミノ酸及びオキシ酸光学異性体の分析に有用であろう。

文 献

- 1) N. Ôi, M. Nagase, T. Doi : *J. Chromatogr.*, **257**, 111 (1983).
- 2) N. Ôi, M. Nagase, Y. Inda, T. Doi : *J. Chromatogr.*, **259**, 487 (1983).
- 3) 大井尚文, 北原 一, 土井 侃, 山本征也 : 分化, **32**, 345 (1983).
- 4) N. Ôi, H. Kitahara : *J. Chromatogr.*, **285**, 198 (1984).
- 5) N. Ôi, H. Kitahara : *J. Chromatogr.*, **265**, 117 (1983).

☆

Enantiomer separation of amino acids and hydroxy acids by high performance liquid chromatography with chiral stationary phases.
Naobumi Ôr and Hajimu KITAHARA (Sumika Chemical Analysis Service Ltd., 3-1-135, Kasugade-naka, Konohana-ku, Osaka-shi, Osaka, 554)

Enantiomer separation of amino acids and hydroxy acids by high performance liquid chromatography has been studied with three chiral stationary phases: [I] (S)-1-(α -naphthyl)ethyl amine, [II] *N*-(1*R*, 3*R*)-*trans*-chrysanthemoyl-D-phenylglycine, [III] *N*-*t*-butylaminocarbonyl-L-valine chemically bonded to 3-aminopropyl silica gel respectively. Various amino acid ester enantiomers were separated with good separation factors as *N*(*O*, *S*)-3,5-dinitrobenzoyl derivatives on [I] and [II] except in the case of proline. Hydroxy acid ester enantiomers were not separated in the form of 3,5-dinitrobenzoyl derivatives, but separated in the form of 3,5-dinitrophenylurethane derivatives on [I] and [III]. Proline ester enantiomers were also separated as *N*-3,5-dinitrophenyl urea derivatives. These results show that the incorporation of the NH group may contribute effectively to the hydrogen bonding interaction with chiral stationary phases for the separation of enantiomers.

(Received February 14, 1984)

Keyword phrases

enantiomer separation of amino acids and hydroxy acids; high performance liquid chromatography; chiral stationary phases.

高速液体クロマトグラフィーによる ヒト尿中遊離型グルココルチコイド の蛍光定量

関 得一郎[®], 山口 賀久*

(1984 年 2 月 22 日受理)

1 序 言

尿中のコルチゾール濃度は血中の遊離コルチゾール濃度を反映するものとして高速液体クロマトグラフィーとラジオイムノアッセイの組み合わせ¹⁾、2種のクロマトグラフ系を使用する高速液体クロマトグラフィー²⁾などにより測定されている。一方著者らは 17-ヒドロキシコルチコステロイドをグリシンアミドとアルカリ性で 0.0025% のフェリシアン化カリウムの存在下に加熱し、蛍光法で定量する方法を開発したので³⁾、これを尿より吸着法により得たコルチゾールを含む画分の高速液体クロマトグラフィーでの分離後のポストラベル蛍光法に適用しコルチゾン及びコルチゾールの定量を試みた。

2 実 験

2.1 吸着法によるコルチゾールを含む画分の採取

尿 5 ml に 2 g の硫酸アンモニウム、0.1 ml の 3 mol/l の硫酸、及び 0.60 ml の Amberlite CG-50 (粒子の大きさ 100~120 μ m) を含む pH 2.5, 35% 硫酸アンモニウム水溶液 2.0 ml を添加してかき混ぜた後、pH 2.5 の 35% 硫酸アンモニウム水溶液と平衡化した Amberlite CG-50 のカラム (0.5 $\times$ 9 cm) に添加し、ピーカーの内壁を 2 ml の pH 2.5 の 35% 硫酸アンモニウム水溶液及び 1 ml の 0.2% 硫酸水溶液で洗い、洗液をカラムに添加した後 3.0 ml の 0.2% 硫酸水溶液をその上に重層する。それがカラムの中に入った後 3.0 ml の 0.2% 硫酸水溶液とエタノール (3:1, v/v) の混合液と 1.5 ml の 2% 酢酸水溶液とエタノール (7:3, v/v) の混合液でカラムを洗浄する。次いでカラムを Fig. 1 に示すように細長い試験管の中にさし込み 37°C の恒温槽に入れ、15 分後に 4.0 ml の 2% 酢酸水溶液とエタノール (7:3, v/v) の混合液でコルチゾールを溶出する。この画分より 7.0 ml を分液漏斗に移し、1.5 g の硫酸アンモニウム、2.0 ml の 4 mol/l 水酸化ナトリウム水溶液

* 大阪大学医療技術短期大学部 : 560 大阪府豊中市待兼山町 1-1

Fig. 1 Chromatographic tube for Amberlite CG-50

1: Resin column (Its final height was 12 cm), 2: Rubber sleeve, 3: Sample and eluent reservoir, 4: Test tube

及び 25 ml の酢酸エチルを加えて振り混ぜた後酢酸エチル相を 4.0 ml の 0.1 mol/l の水酸化ナトリウム水溶液, 2.0 ml の水及び 2.0 ml の 0.2 mol/l 酢酸水溶液で洗浄し, 50 ml フラスコ中で酢酸エチルを減圧下に蒸発乾固し, 残留物を 1.0 ml の 50 % メタノールに溶解して試料とし, その 50 μ l を分析に使用した。

2.2 コルチゾール画分の分離定量

ODS カラム (Finepak C₁₈, 0.46 $\times$ 25 cm, 日本分光製) を用いるときは移動相にメタノールと水 (4:5, v/v) の混合液を, ポリスチレンゲルカラム (Shodex RS_{pak} DS-613, 昭和電工製) を用いるときには移動相にメタノールと水 (2:1, v/v) の混合液を用いた。高速液体クロマトグラフには Trirotar III (日本分光製) を用い, 移動相を流速 1.0 ml/min で送液した。ODS カラムの圧力は 90 kg/cm², ポリスチレンゲルカラムの圧力は 45 kg/cm² であった。

0.01 % のフェリシアン化カリウムを含む pH 10.3, 0.5 mol/l のホウ酸カリウム緩衝液と 0.25 % のホウ酸を含む 0.5 % のグリシンアミド水溶液を二連のレシプロ型ポンプ (SP-24-2, 日本分光製) を用いて各 0.4 ml/min の流速で送液, 混合した後溶出液と混合し内径 0.5 mm, 外径 1.5 mm, 長さ 30 m のテフロン管を通し 95 °C に 3 分間加熱した後フローセル (40 μ l) を備えた分光蛍光光度計 (FP-550F, 日本分光製) で励起光 325 nm, 蛍光 385 nm, スリット幅 20 nm で蛍光強度を測定した。

3 結果及び考察

ODS カラムを用いたときにはコルチゾンがコルチゾールより先に溶出され, ポリスチレンゲルカラムを用いるとコルチゾールがコルチゾンより先に溶出された。正常人尿を分析するとコルチゾール及びコルチゾンの保持時間に一致するピークが検出された。Fig. 2 及び Fig. 3 に示した同一試料を分析した例では, 標準試料のピーク高さより計算するとコルチゾン及びコルチゾールの測定値がいずれも 16 ng 及び 9.5 ng であったが, ロットの異なる尿試料でポリスチレンゲルカラムからのコルチゾンの保持時間に一致するピークの形状がゆがんでいる場合も認められた。ODS カラムでもコルチゾンの保持時間に一致するピークは不純物の妨害を受けやすいと考えられるので, 本法は尿中の遊離型グルココルチコイドのうちのコルチゾールの定量により適していると思われる。

Fig. 2 Elution pattern of cortisol fraction of urine from a normal human female

Column: ODS (Finepak C₁₈, 0.46 $\times$ 25 cm), Mobile phase: Methanol: water=4:5, v/v, Temperature: Ambient (5~10 °C); 1: Cortisone, 2: Cortisol

Fig. 3 Elution pattern of cortisol fraction of urine from a normal human female

Column: Polystyrene gel (Shodex RS_{pak} DS-613), Mobile phase: Methanol: water=2:1, v/v, Temperature: 40 °C; 1: Cortisone, 2: Cortisol

本法による正常人尿中のコルチゾール値は尿 1 ml 当たり 14~90 ng であり文献上の正常範囲²⁾にあった。又, 尿試料に添加した 1 μ g のコルチゾン及びコルチゾールの回収率は 90 % (R. S. D. 7 %) であった ($n=5$)。

文 献

- 1) M. Schöneshöfer, A. Fenner, G. Altinok, H. J. Duke : *Clin. Chim. Acta*, **106**, 63 (1980).
- 2) J. Nakamura, M. Yakata : *Clin. Chem.*, **29**, 847 (1983).
- 3) T. Seki, Y. Yamaguchi : *J. Liq. Chromatogr.*, **6**, 1131 (1983).

☆

Fluorometric determination of free glucocorticoids in human urine by high performance liquid chromatography. Tokuchiro SEKI and Yoshihisa YAMAGUCHI (College of Bio-Medical Technology, Osaka University, 1-1, Machikaneyamacho, Toyonaka-shi, Osaka, 560)

In order to determine human urinary cortisol by high performance liquid chromatography and fluorometry, prepurification of cortisol in human urine by an open column chromatography on Amberlite CG-50 was examined. A fraction containing cortisol and cortisone was obtained from human urine by adsorption on a column of Amberlite CG-50 in the presence of 35 % ammonium sulfate at pH 2.5 and elution with acidic aqueous ethanol. Ethyl acetate extract of the fraction was analyzed using ODS column (Finepak C₁₈) and polystyrene gel column (Shodex RS_{pak} DS-613). Both gave two peaks that had retention time corresponding to that of cortisol and cortisone respectively. The recovery of 1 µg of cortisol and cortisone added to a urine sample was 90 per cent with R. S. D. of 7.0 % (n=5) and 2 ng of cortisol and cortisone could be detected.

(Received February 22, 1984)

Keyword phrases

cortisol and cortisone in human urine; high performance liquid chromatography; fluorometric determination of cortisol and cortisone using glycinamide.

紫外吸光度検出イオンクロマトグラフィーによる野菜中の無機イオンの定量

早川 和一[Ⓐ], 蛭名 令子^{*},

松本美枝子^{**}, 宮崎 元一^{*}

(1984 年 2 月 20 日受理)

1 緒 言

野菜の発育は、無機イオンの吸収と密接な関係があり、無機イオンの過剰、欠乏、あるいはバランス変化による代謝異常が知られている¹⁾。そこで、これらの代謝異常の機序を解明し、正常な発育を行わせるためには、野菜や土壌に含まれる無機イオンの存在量や挙動について十分な知見が必要であり、そのためには、まずこれらのイオンを正確かつ迅速に分析することが要請されている。

著者らは、既に、紫外吸収検出器を備えた普及型高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 装置と市販イオン交換カラムとの組み合わせで無機イオンの分析が可能²⁾、吸光度検出イオンクロマトグラフィーを報告し³⁾、更に無機陽イオン及び無機陰イオンの分離と検出を詳細に検討した³⁾⁴⁾。そこで、この方法を野菜の無機イオンの定量に適用するための分離条件を検討したところ、簡単な前処理を施すだけで、主な無機イオンが容易に分析できることが明らかになったので報告する。

2 実 験

2.1 野菜試料

本研究で使用した野菜は、著者の一人が所属する試験場で栽培したもの、及び市販品である。

2.2 試 薬

HPLC 溶離液の調製に用いた試薬は、すべて市販特級品である。又、陰、陽イオンの標準溶液は、それぞれ特級塩化ナトリウム、亜硝酸ナトリウム、硝酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、硫酸カリウム、硫酸マグネシウム及び塩化カルシウム (いずれも和光純薬工業又は半井化学製) を用いて調製した。

* 金沢大学薬学部衛生化学教室 : 920 石川県金沢市宝町 13-1

** 富山県農業試験場野菜花き試験場 : 939-13 富山県砺波市五郎丸 288