炎光光度検出ガスクロマトグラフィー による生体試料中タウリンの定量

岡崎庸樹，片岡洋行[®]，藤本あゆみ，
河野恭子，蒔田政見*

(1989年3月22日受理)

1 緒　　言

タウリンは、動物の組織や体液中に多量に存在することが知られており¹⁾、近年、胆汁酸との抱合以外にも神経組織に対する調節作用²⁾、膜の安定化作用³⁾、抗酸化作用⁴⁾などさまざまな重要な役割を演じていることが報告されている。

従来、タウリンの定量にはアミノ基の検出に基づく方法が一般に用いられているが、生体試料中に共存する多くのアミンやアミノ酸類の妨害を取り除くために面倒な前処理を必要とする^{5)~9)}。

最近、著者らはタウリンを *N*-イソプトキシカルボニル (*N*-*iso* BOC) プチルアミド誘導体として水素フレーンイオン化検出ガスクロマトグラフィー (FID-GC) により定量する方法を確立し、生体試料の分析に十分適用できることを報告した^{10)~12)}。しかし特定の組織の微小部位や細胞レベルでの分布を知る必要がある場合には、更に高感度の定量法が要求される。そこで本研究では、含硫化合物に高選択的な炎光光度検出 (FPD)-GC とキャピラリーカラムを用いて高感度なタウリンの定量法を確立し、マウスの組織や体液試料の分析に応用した。

2 実　　験

2・1 試　薬

ナカライテスク製タウリン及び内部標準 (I.S.) として用いた Sigma 製 3-アミノ-1-プロパンスルホン酸 (APS) はそれぞれ精製水に溶かして 2 mM とし、密栓して冷蔵保存し、これを用時希釈して用いた。

クロロギ酸イソプチル (*iso* BCF) は東京化成工業製を用いた。

東京化成工業製セチルジメチルベンジルアンモニウムクロリド (CDMBA-Cl) はメタノールに溶かして 10%

溶液として用いた。

ナカライテスク製ジプチルアミン (DBA) は特級アセトニトリルに溶かして 2 M 溶液として用いた。

その他の試薬は、すべて市販特級品を用いた。

2・2 GC 及び測定条件

FID 及び FPD 付き島津ガスクロマトグラフ GC-7A 型を用いた。分離カラムは、J & W 製 DB-1 (長さ 15 m, 内径 0.53 mm, 膜厚 1.5 μ m) を用いた。測定条件は、注入口及び検出器温度 270°C, カラム温度 240°C, 窒素流量 15 ml/min で行い、クロマトグラムの記録には Hewlett-Packard 製インテグレーター HP3390A 型を使用した。

2・3 誘導体化操作

既報¹²⁾に従い試料溶液 (タウリン 0.2~5 nmol を含む) をスクリーキャップ付き試験管 (岩城硝子製 10 cm $\times$ 1.3 cm i.d.) に取り、これに 0.5 mM APS (I.S.) 0.1 ml, 0.5 M 水酸化ナトリウム 0.1 ml 及び精製水を加えて 1 ml とし、更に *iso* BCF 0.1 ml を加えて室温で 5 分間振り混ぜ機で振り混ぜる。反応液に 0.5 M 塩酸 0.2 ml を加えジエチルエーテル 3 ml で 2 回抽出し過剰の *iso* BCF 及び試料中の混在物を除く。水相に 10% CDMBA-Cl 溶液 0.05 ml 及び塩化メチレン 2 ml を加え 3 分間振り混ぜイオン対抽出する。遠心分離 (3500 rpm, 1 分間) 後、有機相をパスツールピペットで水相を吸い込まないように注意して別の試験管に移す。溶媒除去後、残留物に塩化チオニル 0.2 ml を加え、80°C にて 15 分間加温する。反応後過剰の塩化チオニルを乾燥空気が流下留去し、残留物に 2 M DBA 溶液を加えて 5 分間室温に放置する。この反応液に 20% リン酸 1 ml を加えてペンタン 3 ml で 2 回抽出し、溶媒除去後残留物を酢酸エチル 0.1 ml に溶かして、その 1 μ l を GC に付す。

2・4 生体試料の調製

1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 週齢の雄性 ddY マウスそれぞれ 14, 12, 11, 11, 10, 6, 5 匹及び 6 週齢雌性 ddY マウス 6 匹を用いた。各動物は解剖して各組織に分離した後、ウルトラディスパーサー LK-21 型 (ヤマト科学製) で均一にし、その約 0.1 g を精ひょうして 2 mM APS (I.S.) 1 ml 及び精製水 4 ml を加えウルトラディスパーサーでホモジナイズする。得られたホモジネートを精製水で 30 倍希釈し、その 0.4 ml を誘導体化する。又 6 週齢雌性 ddY マウス 6 匹の 24 時間尿及び血清

* 岡山大学薬学部：700 岡山県岡山市津島中1-1-1

Fig. 1 Chromatograms obtained from standard (A), mouse brain (B), liver (C), urine (D) and serum (E) by FPD-GC

GC conditions — Column: DB-1 (15 m×0.53 mm i.d., 1.0 μm film thickness); Column temperature: 240°C; Injection and detector temperature: 270°C; N₂ flow rate: 15 ml/min; Attenuation: 1×10. Peaks: 1 = taurine, 2 = APS (I.S.)

は、それぞれ精製水で 5000 倍及び 80 倍希釈して、その 0.2 ml に 0.5 mM APS (I.S.) 0.1 ml を加え誘導体化する。

3 結果及び考察

3・1 誘導体化及び GC 分析

既報^{10)~12)}により確立された方法により、タウリンは定量的に *N*-iso BOC ジブチルアミド誘導体へ変換され、DB-1 キャピラリーカラムを用いることにより良好なクロマトグラムが得られた (Fig. 1A)。タウリン標準溶液 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 nmol に APS (I.S.) 5 nmol を加え、誘導体化して得られた検量線は、両対数プロットにより良好な直線性 $\{\log y = 1.121 \log x - 0.589; y: \text{ピーク面積比}, x: \text{タウリン量 (nmol)}\}$ を示した (相関係数 $r = 0.9973$, $n = 15$)。FPD-GC によるタウリンの検出限界は GC 注入量として約 1 pmol であり、FID-GC の場合に比べ約 20 倍の感度を有することが分かった。含硫アミノ酸を除く他の一般のアミノ酸やアミン類は *N*-iso BOC 化後の酸性エーテル抽出により除かれ、又これら化合物の FPD に対する感度もタウリンに比べ 1/100 以下であった。一方システインやメチオニンなどの含硫アミノ酸はタウリン同様 FPD に選択的感度を示すが、これらの化合物は *N*-iso BOC 化後の酸性

Table 1 Recoveries of taurine added to mouse tissues and biological fluids

Sample	Taurine added (μmol/g)	Amount found (μmol/g)		Recovery, %
		No-addition	Addition	
Brain	8.2	7.7 ± 0.3 [†]	16.4 ± 0.6	106.1
Heart	22.3	26.3 ± 0.2	48.5 ± 0.6	99.6
Liver	7.7	14.9 ± 0.6	23.1 ± 0.3	106.5
Kidney	6.1	10.1 ± 0.2	16.0 ± 0.4	96.7
Urine	(μmol/ml)	(μmol/ml)		
	50.0	55.5 ± 3.6	108.3 ± 6.3	105.6
Serum	0.80	0.64 ± 0.07	1.45 ± 0.10	101.3

[†] Mean ± SD ($n = 3$)

Table 2 Changes in the taurine contents in mouse tissues during growth

Age (weeks)	Taurine content/μmol g ⁻¹			
	Brain	Heart	Liver	Kidney
1	19.0 ± 0.5 [†]	16.0 ± 1.1	7.3 ± 0.1	11.9 ± 0.2
2	18.4 ± 1.2	22.5 ± 0.9	8.0 ± 0.4	9.4 ± 0.6
4	12.3 ± 0.5	25.7 ± 0.6	10.3 ± 0.3	7.2 ± 0.04
6	9.4 ± 0.2	29.4 ± 0.2	11.3 ± 0.3	7.5 ± 0.2
8	10.1 ± 0.2	31.6 ± 2.1	10.6 ± 0.2	7.9 ± 0.5
12	10.2 ± 0.5	31.9 ± 0.4	13.9 ± 0.4	9.5 ± 0.6
16	9.8 ± 0.2	31.8 ± 0.4	12.7 ± 0.1	8.9 ± 0.2

[†] Mean ± SD ($n = 3$)

エーテル抽出により除かれクロマトグラム上に何ら妨害を与えなかった。以上のことから、キャピラリーカラムと FPD を用いることにより、FID-GC 法に比べ高選択的かつ高感度にタウリンを定量できることが分かった。

3・2 生体試料分析への応用

従来の方では試料の除タンパク及びイオン交換クロマトグラフィーなどによるクリーンアップを必要としたが、本法ではタウリンに選択的かつ高感度であることから何ら前処理を行うことなく用いることができた。Fig. 1B~E にマウスの組織及び体液から得られたクロマトグラムを示したが、いずれも妨害ピークは全く認められず、特異的にタウリンのみを検出できることが分かった。6 週齢の雌性マウスの各組織及び体液に既知量のタウリンを添加して回収率を求めた結果、Table 1 に示すように回収率は 96~107% の範囲で、良好な再現性を示した。又 Table 2 に 1~16 週齢の雄性マウスの各組織におけるタウリン含量を示した。以上より本法を用いれば除タンパク操作が不用で、組織試料の場合数十 μg、尿の場合数十 nl、血清の場合数 μl もあれば十分測定が可能であり、微量試料中のタウリン定量を必要とす

る研究において有用な手段になると考えられる。

文 献

- 1) J. G. Jacobsen, L. H. Smith : *Physiol. Rev.*, **48**, 425 (1968).
- 2) K. Kuriyama : *FEBS Lett.*, **39**, 2680 (1980).
- 3) H. Pasantes-Morales, C. E. Wright, G. E. Gaull : *J. Nutr.*, **114**, 2256 (1984).
- 4) O. I. Aruoma, B. Halliwell, B. M. Hoey, J. Butles : *Biochem. J.*, **256**, 251 (1988).
- 5) S. C. Datta, A. Naryanaswami : *Ital. J. Biochem.*, **32**, 297 (1983).
- 6) M. Eslami, J. D. Stuart : *J. Liq. Chromatogr.*, **7**, 1117 (1984).
- 7) L. L. Hirschberger, J. De La Rosa, M. H. Stipanuk : *J. Chromatogr.*, **343**, 303 (1985).
- 8) T. Hirai, H. Ohyama, R. Kido : *Anal. Biochem.*, **163**, 339 (1987).
- 9) G. Anderson, T. A. Durkin, M. Chakraborty, D. J. Cohen : *J. Chromatogr.*, **431**, 400 (1988).
- 10) H. Kataoka, S. Yamamoto, M. Makita : *J. Chromatogr.*, **306**, 61 (1984).
- 11) 片岡洋行, 松葉加代, 蒔田政見 : 薬誌, **104**, 1054 (1984).
- 12) 片岡洋行, 大石和之, 井上紀子, 蒔田政見 : 分析化学, **34**, 128 (1985).

☆

Determination of taurine in biological sample by GC with flame photometric detection. Tsuneki OKAZAKI, Hiroyuki KATAOKA, Ayumi FUJIMOTO, Kyoko Kono and Masami MAKITA (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1, Tsushima-naka, Okayama-shi, Okayama 700)

A selective and sensitive method for the determination of taurine by GC is described. Taurine was converted into its *N*-isobutoxycarbonyl dibutylamide derivative by the procedure reported previously [Bunseki Kagaku, **34**, 128 (1985)], and analyzed by GC with flame photometric detection (FPD-GC) using DB-1 capillary column. By FPD-GC, a linear calibration curve was obtained in the range of 0.2~5.0 nmol of taurine, and the detection level was about 20 times more sensitive than that obtained by GC with flame ionization detection. Taurine in biological sample could be measured without any influence of coexistent substances. The recoveries of taurine added to mouse tissues and biological fluids were 96~107% and the reproducibility was found to be satisfactory. Analytical results of taurine contents in mouse tissues during growth are also presented.

(Received March 22, 1989)

Keyword phrases

gas chromatographic determination of taurine; flame photometric detection of taurine as its *N*-isobutoxy-

carbonyl dibutylamide derivative; variation of taurine contents in mouse tissues during growth.

黒鉛炉原子吸光法による銀と銅の同時定量

多賀光彦[®], 田中俊逸, 櫻田 修*

(1989年3月7日受理)

1 緒 言

黒鉛炉原子吸光法において、測定元素によって原子化温度が異なるので¹⁾、そのピークの出現する時間に差が生じることは良く知られている。銀と銅の場合には、先に銀が原子化し、続いて銅が原子化されるため、両者の吸収プロファイルには時間的な差が生じる。一方、AASで用いられる共鳴線は銀が 328.07 nm、銅が 327.40 nm であり、両者は極めて近接している。そのため、通常の装置における分光器のスリット幅ではこれらを分離することはできず、同一バンドパス内に入る。そこで、本報では銀と銅の共鳴線を一本の光束として分光器の同一バンドパス内に入れ、黒鉛炉内での銀と銅の原子化時間の差を利用して、両者を同時定量する方法について検討した。この際、マトリックス修飾剤としてパラジウムあるいは白金を添加することにより、銀と銅のピークの分離が改善され、銅の共存によって生ずる銀への干渉を除くことができた。

2 実 験

2・1 装 置

原子吸光分析装置には、日立 170-50 形原子吸光分光光度計に日立 GA-2 形グラフィートオートマイザーを装着して使用した。得られる吸収信号の記録は既報²⁾に準じ A/D 変換器を通してコンピューターに取り込んだ。機器の測定条件を Table 1 に示す。黒鉛炉の加熱は銀と銅の原子化時間の差を大きくするため、ランプモードを用い、徐々に時間をかけて行った。光源部は、通常の中空陰極ランプ位置と、バックグラウンド補正用重水素

* 北海道大学理学部化学教室 : 060 北海道札幌市北区北 10 条西 8 丁目