高速液体クロマトグラフィーによる安定型グリコヘモグロビン A_{1c} の定量

水野昌子[®], 栃木憲治^{*}, 伊藤正人, 三浦順吉^{**}

(1991年3月25日受理)

HPLC によるグリコヘモグロビン, 特に安定型 A_{1c} (s-A_{1c}) の高速分析法について検討した. メタクリレート系ゲルにカルボキシメチル基を導入した 5 μ m 充てん剤 (市販品レベル) と 3.5 μ m 充てん剤を試作し, 微粒化による分離性能の改善並びに分析時間の短縮の可能性について調べた. その結果, 3.5 μ m 充てん剤を用いることにより, 5 μ m 充てん剤の場合の 2 倍の高速分析が可能となった. 又, A_{1a}, A_{1b}, HbF, 不安定型 A_{1c}, 安定型 A_{1c} 及び A₀ の 6 成分を 3.5 分サイクル (従来比 1/2 以下) で分析できた.

1 緒 言

グリコヘモグロビン (GHb) は多種成分の総称であり, A_{1a}, A_{1b}, A_{1c} などから成る. そのうち A_{1c} が過去 2 か月前後の平均的な血糖値と相関があることから, 糖尿病の経過観察やスクリーニングの指標として用いられている¹⁾.

ところで, A_{1c} には安定型 A_{1c} (s-A_{1c}) と不安定型 A_{1c} (l-A_{1c}) の 2 成分がある²⁾. l-A_{1c} は食事などによる血糖濃度の変化に依存して急激に変動し, A_{1c} の測定値に誤差を与える. 又, l-A_{1c} 自体に臨床的意義があるという報告もあり³⁾, l-A_{1c} と s-A_{1c} とを分離して測定するほうが望ましい. 現在, s-A_{1c} の分析は A_{1c} の分析に比べて 2 倍以上の時間がかかる⁴⁾ため, A_{1c} (l-A_{1c}+s-A_{1c}) を指標として用いている場合のほうが多い.

本報では, l-A_{1c} と s-A_{1c} とを短時間かつ高分離に測定する方法について検討した. HPLC において, 分離能や分析時間は主として充てん剤に依存することが知られている. そこで, 粒径約 5 μ m (市販品レベル) 及び 3.5 μ m 充てん剤を試作し, 微粒化による分離能の改善並びに分析時間の短縮の可能性について調べた. そして, 3.5 μ m 充てん剤を用いた場合, 溶離条件を最適化することにより, 3.5 分サイクル (従来の A_{1c} の分析時

間) で s-A_{1c} を分離できる見通しを得たので, その結果について報告する.

2 実 験

2・1 充てん剤

充てん剤としてはメタクリレート系ゲルにカルボキシメチル基を導入した弱酸性陽イオン交換樹脂を用いた. これらの充てん剤は粒径約 5 μ m (市販品レベル) 及び 3.5 μ m で, 細孔径が等しくなるように合成した.

2・2 試料及び試薬

溶離液, スラリー溶媒及び充てん溶媒として, リン酸一カリウム, リン酸水素二カリウム, リン酸一ナトリウム二水和物, リン酸水素二ナトリウムの水溶液を使用した. これらの試薬はいずれも和光純薬工業製試薬特級を用いた.

カラム性能の評価用試料としては, HbA_{1c} リファレンススタンダード (Bio Rad Inc. 製) 及び正常成人の全血を 0.1% Triton X-100 水溶液で 200 倍に希釈した溶血液を用いた.

GHb ピークの同定には, フルクトース-1,6-二リン酸, グルコース-6-リン酸, ピルビン酸及びグルコースを用いた. これらの試薬を 1 mg/ml になるように蒸留水で希釈して使用した.

2・3 充てん方法

カラムとして, 3.5 μ m 充てん剤の場合には 4.6 mm i. d.×35 mm, 5 μ m 充てん剤の場合には 4.6 mm i. d.×35

* (株)日立製作所日立研究所: 319-12 茨城県日立市久慈町 4026

** (株)日立製作所那珂工場: 312 茨城県勝田市市毛 882

Table 1 Analytical condition-I (linear gradient)

Analytical column	(a) 5 μ m packings (4.6 mm i.d. $\times$ 35 mm) (b) 3.5 μ m packings (4.6 mm i.d. $\times$ 35 mm)
Mobile phase	[eluent A] 48.8 mM potassium phosphate buffer (pH 6.20) [eluent B] 210 mM sodium phosphate buffer (pH 6.10)
Elution condition	linear gradient, from 0% to 48% (v/v) eluent B in 8 min
Flow rate	1.0 ml/min
Column temp.	23°C
Sample	HbA _{1c} reference standard (Bio Rad Inc.) hemolysate (anticoagulated blood diluted with 0.1% Triton-X 100)
Sample volume	10 μ l
Detection	415 nm

mm 及び 4.6 mm i. d. $\times$ 80 mm のステンレス製カラム (梅谷精機製) を用いた。カラムへの充てんにはいずれもスラリー法を用い、150 kg/cm², 60 分で充てんした。スラリー溶媒及び充てん溶媒としては溶離液の A 液 (Table 1) と同じ組成の溶媒を用いた。

2・4 装置及び測定条件

HPLC 装置の構成は以下のようにした。ポンプ: 日立 L-6200 形, オートサンプラー: 日立 AS-4000 形, UV-VIS 検出器: 日立 L-4200 形, データプロセッサー: 日立 D-2500 形。

なお、クロマトグラムの測定条件を Table 1~3 に示す。

2・5 充てん剤物性の測定方法

粒径分布の測定には 70°C で 8 h 常圧乾燥した充てん剤を、細孔径分布及び比表面積の測定には 70°C で 8 h 常圧乾燥後、50°C で 10 h 真空乾燥した充てん剤を用いた。粒径分布は走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) 像観察により求めた。加速電圧 1.0 kV, 無蒸着で、倍率 2000 倍にて撮影した写真から約 150 個の粒子の粒径を測定した。比表面積は BET 法⁵⁾, 細孔径分布は水銀打ち込み法⁶⁾, 交換容量は滴定法により測定した。用いた装置を以下に示す。粒径分布: 日立 S-800 形走査型電子顕微鏡, Kevex EDX (画像処理装置), 比表面積: 島津アキュソープ 2001-01 形, 細孔径分布: 島津オートポア

Table 2 Analytical condition-II (stepwise gradient)

Analytical column	5 μ m packings (4.6 mm i.d. $\times$ 80 mm)
Mobile phase	[eluent A] 60 mM potassium phosphate buffer (pH 6.20) [eluent B] 75 mM potassium phosphate buffer (pH 6.20) [eluent C] 210 mM sodium phosphate buffer (pH 6.10)
Elution condition	stepwise gradient, A: 0~0.2 min, B: 0.3~2.2 min, C: 2.3~3.2 min, A: 3.3~7.0 min
Flow rate	1.0 ml/min
Column temp.	23°C
Sample	hemolysate
Sample volume	10 μ l
Detection	415 nm

Table 3 Analytical condition-III (stepwise gradient)

Analytical column	3.5 μ m packings (4.6 mm i.d. $\times$ 35 mm)
Mobile phase	[eluent A] 52.5 mM potassium phosphate buffer (pH 6.20) [eluent B] 67.5 mM potassium phosphate buffer (pH 6.20) [eluent C] 210.0 mM sodium phosphate buffer (pH 6.10)
Elution condition	stepwise gradient, A: 0~0.2 min, B: 0.3~1.4 min, C: 1.5~1.8 min, A: 1.9~3.5 min
Flow rate	1.2 ml/min
Column temp.	23°C
Sample	hemolysate
Sample volume	5 μ l
Detection	415 nm

9220-01 形。

2・6 GHb ピークの同定方法

A_{1a}, A_{1b}, A_{1c} などの GHb はヘモグロビンに糖あるいは糖誘導体が結合したものであり、血液に糖あるいは糖誘導体を加えてそのまま温置することにより生成されることが知られている⁷⁾。

血液を 1% Triton X-100 で 100 倍に希釈したもの 1 ml に 10 mg/ml フルクトース-1,6-二リン酸, グルコース-6-リン酸及びピルビン酸水溶液 1 ml を添加し, 37°C で 1 h 温置したときのピークの増大により, A_{1a1}, A_{1a2} 及び A_{1b} の各ピークの溶出位置を確認した。又, グル

コースの添加によるピークの増大及び生理食塩水の添加, 温置によるピークの減少より I-A_{1c} を, 生理食塩水の添加, 温置によりピークの増減のないことから s-A_{1c} を確認した. 又, HbF が主成分である, さい(臍)帯血でのクロマトグラムとの比較により HbF を確認した.

3 結果及び考察

3・1 充てん剤の物性測定結果

Table 4 に充てん剤の物性測定結果を示す. 微粒化に伴って比表面積及び交換容量が増大した. 3.5 μm 充てん剤のそれらは 5 μm 充てん剤の約 1.5 倍及び 1.3 倍であった.

3・2 5 μm と 3.5 μm 充てん剤のカラム性能比較

Fig. 1 に 5 μm と 3.5 μm 充てん剤を用いて測定した正常成人の血液での GHb のクロマトグラムを示す. 溶離はこう配溶離法 (Table 1) によった. A_{1c} 成分の保持時間 (t_R) は 5 μm 充てん剤で 2.3 min, 3.5 μm 充てん剤で 3.5 min であり, 3.5 μm 充てん剤のほうが保持が強かった. 又, A_{1c} 成分の理論段数 (N) は 5 μm 充てん剤では 380 段, 3.5 μm 充てん剤では 2000 段であり, 約 5 倍に改善された. なお, 理論段数は HbA_{1c} リファレンススタンダードを用いて測定したクロマトグラムより求めた. このように 3.5 μm 充てん剤では微粒化により, 保持が強くなり, かつ N が改善されているので, ピークがシャープであり, Hb をより多くの成分に分離することができた. 又, 5 μm 充てん剤では I-A_{1c} と s-A_{1c} とを分離できなかったが, 3.5 μm 充てん剤では I-A_{1c} を確認することができた. しかし, この溶離条件では I-A_{1c} と s-A_{1c} との分離は完全ではなかった.

5 μm 及び 3.5 μm 充てん剤での溶離液流量 1.0 ml/min におけるカラムの圧力損失 (ΔP) の値は各々 18 kg/cm² 及び 44 kg/cm² であった. 3.5 μm と 5 μm 充てん剤の ΔP の比は 2.4 であり, 粒径の二乗の逆数の比にはほぼ一致した. なお, 3.5 μm 充てん剤での臨界圧は

Fig. 1 Chromatograms of hemoglobin components of hemolysate

Peaks: 1, A_{1a}; 2, A_{1b}; 3, HbF; 4, A_{1c}; 5, A₀; 6, I-A_{1c}; 7, s-A_{1c}. Analytical columns: (a) 5 μm packings (4.6 mm i.d. × 35 mm), (b) 3.5 μm packings (4.6 mm i.d. × 35 mm). Analytical conditions: see linear gradient in Table 1. Sample: hemolysate

220 kg/cm² であり, 耐圧性の点では問題がなかった.

3・3 溶離条件の最適化

上述したように, Table 1 に示した溶離条件では I-A_{1c} と s-A_{1c} とを十分には分離できなかった. そこで, 第一液の濃度を变化させ, I-A_{1c} と s-A_{1c} の分離が改善されるか否かを調べた. Fig. 2 に第一液 (A 液) の濃度と各 Hb 成分の t_R との関係を示した. 第一液の濃度以外の条件は Table 1 に従った. 第一液の濃度が大きくなるにつれ, 各 Hb 成分の t_R が減少したが, t_R の減少の割合は成分によって異なった. 第一液の濃度が大きいほど, HbF と I-A_{1c}, I-A_{1c} と s-A_{1c} の t_R の差は大きくなり, 分離が改善された. しかし, 第一液 56.3 mM では A_{1a} と A_{1b} との分離が不十分であった.

Fig. 3 に第一液の濃度と選択係数 α との関係を示した. 第一液の濃度が大きいほうがわずかではあるが HbF と I-A_{1c}, I-A_{1c} と s-A_{1c} などの選択性も向上することが分かった. Fig. 2 及び Fig. 3 より, 第一液としては 52.5 mM が適していると考えられる.

Fig. 4 に第一液の濃度が 52.5 mM のときのクロマトグラムを示す. Fig. 1(b) に比べて HbF と I-A_{1c}, I-A_{1c} と s-A_{1c} の分離が改善されていることはクロマトグラムからも明らかである.

Table 4 Physical properties of packing materials

Physical property	Packing materials	
	5 μm	3.5 μm
Particle diameter/ μm	5.4 $\pm$ 1.1	3.7 $\pm$ 0.8
Specific surface area/ $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$	9.5	13.0
Pore diameter/nm	85	85
Ion exchange capacity (meq. g ⁻¹)	0.25	0.33

Fig. 2 Effect of concentration of potassium phosphate in initial eluent (eluent A) on retention time of hemoglobin components

Analytical column: 3.5 μ m packings (4.6 mm i.d. $\times$ 35 mm); Mobile phase: [eluent A] potassium phosphate buffer, pH 6.20; [eluent B] 210 mM sodium phosphate buffer, pH 6.10. Other conditions are the same as those in Table 1. Keys: a, first peak; b, A₁a; c, A₁b; d, HbF; e, I-A₁c; f, s-A₁c; g, A₀

Fig. 3 Effect of concentration of potassium phosphate in initial eluent (eluent A) on separation ratio

Analytical column: 3.5 μ m packings (4.6 mm i.d. $\times$ 35 mm); Mobile phase: [eluent A] potassium phosphate buffer, pH 6.20; [eluent B] 210 mM sodium phosphate buffer, pH 6.10. Other conditions are the same as those in Table 1. $\diamond$: s-A₁c/A₀; $\triangle$: HbF/s-A₁c; $\square$: HbF/I-A₁c; $\circ$: I-A₁c/s-A₁c.

Fig. 4 Chromatogram of hemoglobin components of hemolysate

Peaks: 1, A₁a; 2, A₁b; 3, HbF; 4, I-A₁c; 5, s-A₁c; 6, A₀. Analytical column: 3.5 μ m packings (4.6 mm i.d. $\times$ 35 mm); Mobile phase: [eluent A] 52.5 mM potassium phosphate buffer, pH 6.20; [eluent B] 210 mM sodium phosphate buffer, pH 6.10. Other conditions are the same as those in Table 1.

3.4 s-A₁c の高速分析

こう配溶離法での検討結果をもとに、段階的こう配溶離法による s-A₁c の分析について検討した。段階的こう配溶離法では分析目的以外の成分をまとめて溶出させることができるので、分析時間の短縮が可能である。Fig. 5 に 5 μ m 及び 3.5 μ m 充てん剤を用いて段階的こう配溶離法にて GHb を分析したクロマトグラムを示す。溶離条件は各々 Table 2 及び Table 3 に従った。5 μ m 充てん剤では 4.6 mm i.d. $\times$ 80 mm, 3.5 μ m 充てん剤では 4.6 mm i.d. $\times$ 35 mm のカラムを用いた。溶離液の濃度及び切り替え時間は主として第一液で A₁a 及び A₁b, 第二液で HbF, I-A₁c 及び s-A₁c, 第三液で A₀ を含む s-A₁c 以降の成分を溶出させるように設定した。3.5 μ m 充てん剤を用いた場合, A₁a, A₁b, HbF, I-A₁c, s-A₁c 及び A₀ の 6 成分を 3.5 分サイクルで分析することができた。一方, 5 μ m 充てん剤では, 3.5 μ m 充てん剤と同様の分離を得るには 80 mm と長いカラムが必要であり, 上記 6 成分を分析するのに 7 分と 3.5 μ m 充てん剤の場合の 2 倍の時間を要した。

Table 5 に 3.5 μ m 充てん剤を用い, 段階的こう配溶離法にて 3.5 分サイクルで GHb を分析したときの I-A₁c 及び s-A₁c 成分のトータルのヘモグロビンに対する

Fig. 5 Chromatograms of hemoglobin components of hemolysate

Peaks: 1, A_{1a}; 2, A_{1b}; 3, HbF; 4, l-A_{1c}; 5, s-A_{1c}; 6, A₀. Analytical columns: (a) 5 μm packings (4.6 mm i.d. × 80 mm); (b) 3.5 μm packings (4.6 mm i.d. × 35 mm). Analytical conditions: (a) stepwise gradient in Table 2; (b) stepwise gradient in Table 3

比率 (面積比) の繰り返し再現性を示した. s-A_{1c} の繰り返し再現性は R.S.D. で 0.65% であり, 本法は s-A_{1c} を再現性よく分析できる方法であることが分かった.

以上のように, 3.5 μm 充てん剤を用いることにより, 5 μm 充てん剤の場合の約 2 倍の高速分析が可能になった.

又, l-A_{1c}, s-A_{1c} を含む 6 成分を 3.5 分サイクル (従来の A_{1c} の分析時間) で分析することができた. なお, 本充てん剤は 1000 検体以上使用可能であった. 以上のことより, 本法は GHb の高速分析法として有効で

Table 5 Reproducibility of the present method ($n=20$)

Hemoglobin type	Assay value [†] , % (mean ± S.D.)	R.S.D., %
l-A _{1c}	1.13 ± 0.356	3.1
s-A _{1c}	4.86 ± 0.0317	0.65

[†] Percentage of peak area value

あると考える.

(1991 年 1 月, 第 34 回液体クロマトグラフ研究会において一部発表)

文 献

- 1) 中川昌一, 中山秀隆: Glycated hemoglobin, 日本臨床 1986 夏季増刊, 糖尿病-適正な治療と管理, p. 539 (1986), (日本臨床社).
- 2) 松宮和人: 検査と技術, **14**, 1155 (1986).
- 3) 加瀬沢信彦, 新里光子, 丸山信幸, 浦田武義, 小林幸子, 島宗良子, 関野千賀子, 酒井由美子, 片桐智美, 伊豆一雄, 荒井興弘, 金子兼三, 鴨井久司: 臨床病理, **35**, 203 (1987).
- 4) 高橋裕明, 山口昌里, 田中勝之, 村本勝也, 海野益郎: 日本臨床検査自動化学会会誌, **12**, 133 (1987).
- 5) 日本化学会編: “新実験講座 18, 界面とコロイド”, p. 123 (1977), (丸善).
- 6) 日本化学会編: “改訂 3 版化学便覧応用編”, p. 689, (1980), (丸善).
- 7) 星野忠夫, 鈴木美貴子, 穴沢典子, 門屋裕子: 第 31 回液体クロマトグラフ研究会講演要旨集, p. 175 (1989).

Rapid determination of a stable glycated hemoglobin, s-A_{1c}, by HPLC.

Masako MIZUNO, Kenji TOCHIGI*, Masahito ITO and Junkichi MIURA** (*Hitachi Research Laboratory, Hitachi Ltd., 4026, Kuji-cho, Hitachi-shi, Ibaraki 319-12; **Naka Works, Hitachi Ltd., 882, Ichige, Katsuta-shi, Ibaraki 312)

Glycated hemoglobins (GHb) are composed of A_{1a}, A_{1b}, labile-A_{1c} (l-A_{1c}), stable-A_{1c} (s-A_{1c}) and others. The concentration of s-A_{1c} can be used as an index of the average blood glucose value for the preceding 2 months. Therefore, determination of s-A_{1c} is useful for the assessment of long-term control of diabetes mellitus. A rapid analysis method of s-A_{1c} by HPLC was discussed. Packings with 5 μm and 3.5 μm diameter polymethacrylate gel modified with carboxymethyl groups, were prepared, and a correlation between particle diameter of the packings and chromatographic performances, such as number of theoretical plates (N), retention time (t_R), pressure drop (ΔP) were studied. N increased as the particle diameter of packings was decreased. The N for s-A_{1c} by linear gradient elution was 2×10^3 plates for 3.5 μm diameter packing, which was five times larger than that of 5 μm diameter packings. Using 3.5 μm packings, s-A_{1c} was well separated from l-A_{1c} by the optimization of analytical conditions, such as the concentration of the initial eluent. Using the column (4.6 mm i.d. × 35 mm) packed with 3.5 μm

packings, six hemoglobin components, A_{1a}, A_{1b}, HbF, I-A_{1c}, s-A_{1c} and A₀, were separated in a 3.5 min cycle by three step gradient elution, thereby reducing analysis time.

(Received March 25, 1991)

Keyword phrases

determination of glycosylated hemoglobins by HPLC; measurement of stable A_{1c}; correlation between particle diameter and chromatographic performance.