ノ ー ト

陽イオン交換樹脂を用いた血中尿素の固相抽出並びに
高速液体クロマトグラフィー新谷 英晴^{®*}, 井 上 剛^{**}

(1994 年 4 月 13 日受理)

1 緒 言

健康人の場合、タンパク質の最終産物として尿素サイクルで生成する尿素はじんから尿中に排せつされる。尿毒症患者ではじん機能低下のため尿中に排せつされるべき尿素が血中に蓄積し、諸臓器の機能低下、尿素による尿素サイクルのフィードバック阻害、尿素によるタンパク質の変性等が生じる。それゆえ血中尿素を減少させることは不可欠である。そのため人工透析等を行って尿素を含む尿毒症成分の除去が行われている。

ところで透析後血中尿素がどれほど定量的に除去されたかを知る必要がある。そのためには効率的な血中尿素の定量法が不可欠である。

現在臨床機器として血並びに尿中尿素はウレアーゼを固定したアンモニア選択電極で測定されているが、本方法では内因性のアンモニアとの分別分析が不可能である。

現在まで固定化ウレアーゼを用いて血中尿素を分析した例は報告されている^{1)~4)}。しかし、それらの方法には様々な欠点がある。

まず内因性アンモニアと尿素との分別に煩雑さを伴うこと、固定化ウレアーゼの経時的劣化ゆえ分析ごとに検量線を取り直す煩雑さがあること、ポストカラムの場合には溶離液の pH がウレアーゼの至適 pH である 7.4 に限定されること、この溶離液 (pH 7.4) 条件では一級アミノ基を有する尿素はテイリングを起こしやすい欠点があること等である。ウレアーゼで処理後生成したアンモニアの検出には低感度で選択性のない refractive index (RI) 以外の検出方法がないため高感度分析には支障をきたす。

そこで固定化ウレアーゼカラムを用いずに血中尿素を固相抽出 (solid phase extraction, SPE) で血中きょう雑物から分離し分析することを試みた。血中尿素の SPE の報告がなかった理由として、尿素が血中きょう雑物と同時に溶出するためその分離に困難をきたしたためと思われる。著者らはそれらを克服し、血中きょう雑物と十分分離し、再現性の良い SPE 並びに HPLC 条件が確立できたので報告する。

2 実験条件並びに試料

2・1 HPLC 条件

カラム: 三菱化成 MCI GEL CK08S (強酸性陽イオン交換樹脂 (Na 型)) 4.6×150 mm; 溶離液: 1 mM 塩酸水溶液; 流量: 1 ml/min (HPLC 装置 日本分光 PU-980); 検出: UV 200 nm (UV 検出器 日本分光 PU-970); 試料注入量: 20 µl; カラム温度: 35°C; 尿素保持時間: 6 分

2・2 SPE 条件

バリアンボンドエルト[®]: SCX (強酸性陽イオン交換樹脂 (H 型)); 樹脂量: 500 mg; 容積: 2.8 ml; コンディショニング: メタノール 3 ml その後水 3 ml (流量 3 ml/min); 試料量: 血清 1 ml; 洗浄: 水 1 ml (流量 3 ml/min); 溶出: 5% リン酸水溶液 4 ml (流量 1 ml/min)

コンディショニング、洗浄並びに溶出は真空ポンプを用いて行った⁵⁾⁶⁾。

2・3 試 料

尿素 (和光純薬工業製), 血清 (関東化学製)

2・4 限外濾過, 遠心分離

これらは文献 5) 6) に示したものをを用いた。

* 厚生省国立衛生試験所: 158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

** ユニフレックス(株): 277 千葉県柏市高田 537-1

3 結果並びに考察

3・1 HPLC による尿素の検量線

尿素濃度とピーク面積との相関並びに回帰直線はそれぞれ $r=1.0$, $Y=841.5X-13584.9$, であり, 良好な直線性が得られた. 検量線は $600 \mu\text{g/ml}$ を超えて更に直線性を示したが, 内因性尿素濃度 (平均 $328.0 \pm 21.4 \mu\text{g/ml}$, $\text{RSD}=6.5\%$, $n=4$) はこの検量線濃度範囲にあるためこれ以上の検量線の直線性は不要である.

3・2 SPE

SPE の手法は常法に従った⁵⁾⁶⁾. 血清尿素保持のため SPE カラムとして順相, 逆相, イオン交換系等種々の樹脂を検討した. その結果一番保持力のよかった強酸性陽イオン交換カラムを用いることにした.

洗浄液として水を用い, その液量を $0\sim 4 \text{ ml}$ と変化させた. $0\sim 2 \text{ ml}$ までは SPE カラムに保持された尿素は溶出されなかった. 3 ml を超えると溶出された. それゆえ実験条件としては 1 ml に設定した.

洗浄後 SPE カラムに保持された尿素の溶出には 5% リン酸水溶液を用い, 以下の溶出条件を検討した. 1) 1 ml を 4 回, 2) 2 ml を 2 回並びに 3) 4 ml を 1 回である. それぞれの回収率は $96.0, 96.8, 93.7\%$ であり良好な回収率が得られた. すなわち計 4 ml で溶出すればほぼ完全に回収されることが分かった.

次に内因性尿素を含む血清に対して尿素標準液 (濃度 1 mg/ml) を $9:1$ の割合で添加し回収率を求めたところ 101.9% , $\text{RSD}=2.2\%$ ($n=4$) とほぼ満足な結果が得られた.

次に血清タンパク質と結合している尿素と遊離尿素と

を分別定量するため排除限界 10000 ダルトンの限外濾過セルロース膜を用い 1767 g で遠心分離して濾液を得た. 試料としては血清に尿素標準液 (濃度 1 mg/ml) を $9:1$ の割合で添加した血清を用いた. その理論尿素量と濾液を SPE 並びに HPLC で定量した結果得られた尿素量との比較から濾液中には 104.5% の尿素が回収されたことが分かった.

この実験で血清タンパク質と結合している尿素はほとんどなく, 血清中にはほとんどが遊離型尿素で存在すると推定される.

以上の結果血中尿素を血中きょう雑物と十分分離できる HPLC 条件並びに血中尿素を十分再現性よく回収できる SPE 条件が確立できた.

自動化された SPE とオートインジェクター並びに自動化された HPLC と組み合わせれば, 本条件で自動化臨床検査機器の開発が可能であり, 現在臨床機器として専ら用いられているアンモニアイオン選択電極よりはるかに選択性並びに感度の点で優れた臨床機器になるものと期待される.

文 献

- 1) H. Shintani, H. Suzuki: "Bioinstrumentation and Biosensors", Edited by D. L. Wise, p. 181 (1990), (Marcel Dekker, Inc., New York).
- 2) H. Shintani: *J. Chromatogr.*, **378**, 95 (1986).
- 3) H. Shintani, S. Ube: *J. Chromatogr.*, **344**, 145 (1985).
- 4) H. Shintani, A. Wojcik: "Enzyme Reaction Detection in Liquid Chromatography", Edited by S. K. Lam, in press (1994), (Blakie and Son, Inc., New York).
- 5) H. Shintani: *J. Anal. Toxicol.*, **15**, 198 (1991).
- 6) H. Shintani: *J. Anal. Toxicol.*, **17**, 73 (1993).

Determination of blood urea using cation exchange column solid phase extraction combined with HPLC. Hideharu SHINTANI and Takashi INOUE** (*National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158; **Uniflex Co. Ltd., 537-1, Takada, Kashiwa-shi, Chiba 277)

To determine blood urea accurately in uremia patients, a simple analytical procedure combining a solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) was studied. SPE was performed using Bond Elute SCX (resin weight, 500 mg ; resin volume, 2.8 ml) which was conditioned with 3 ml of methanol followed by 3 ml of water and eluted with 4 ml of 5% phosphate solution. For HPLC, MCIgel CK08S ($4.6 \times 150 \text{ mm}$) was eluted with 1 mM HCl at a flow rate of 1 ml/min and column temperature at 35°C with detection at 200 nm . By comparing ultrafiltrated blood urea and native blood urea, the blood urea from the HPLC chromatogram was found to be

completely free of blood admixtures and almost free of blood protein. We concluded that the current clinical method of blood urea determination which uses an ammonia selective electrode could be replaced by our method which is more selective and provides more accurate and reliable data for diagnosis.

(Received April 13, 1994)

Keyword phrases

solid phase extraction; strong cation exchanger; HPLC; urea; uremia.