技術論文

高速液体クロマトグラフィーによる血清中のグルクロン酸の定量

花岡 祐子*, 四角目和広^B*, 松本 保輔*, 矢可部芳州**,
樽井 行弘***, 佐山 義克***

Determination of glucuronic acid in serum by HPLC

Yuko HANAOKA, Kazuhiro SHIKAKUME, Yasusuke MATSUMOTO*, Yasukuni YAKABE**,
Yukihiro TARUI and Yoshikatsu SAYAMA***

*Chemical Standards Department, Tokyo Laboratory, Chemicals Inspection and Testing Institute, Japan, 1-1-4, Higashi Mukoujima, Sumida-ku, Tokyo 131-0032

**Chemical Assessment Center, Chemicals Inspection and Testing Institute, Japan, 19-14, Chuo-machi, Kurume-shi, Fukuoka 830-0023

***Product Development Department, Personal Health Care Division, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., 2-1-9, Kyobashi, Chuo-ku, Tokyo 104-0031

(Received 31 July 1997, Accepted 9 November 1997)

An analytical method for the determination of glucuronic acid in human serum was developed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using an ion-pair method, and the optimum analytical conditions were investigated. This method involves the acidic degradation of 200 μ l of human serum with 4 M sulfuric acid, neutralization with sodium hydroxide, a reaction with 0.5 M 3-methyl-1-phenyl-5-pyrazolone (PMP)-methanol, and neutralization with 0.4 M sulfuric acid. Excess reaction reagent was extracted with chloroform, and an aliquot of the aqueous solution was injected to the HPLC. By using an ion-pair reagent, glucuronic acid and glucose in human serum could be separated. Under the optimized analytical conditions, the calibration curve was linear over the range 5~50 mg/l. The recoveries of glucuronic acid from human serum samples at a level of 5~50 mg/l were 82~94%. The intra-day and inter-day precision of the method were 0.6~4.3% ($n=5$) and 4.3~6.9% ($n=5$), respectively. The concentration of glucuronic acid in human serum was constant for 30 days at -20°C . This method was applied to the determination of glucuronic acid in human serum after single oral administration of glucuronolactone to volunteers.

Keywords: HPLC; determination of glucuronic acid; ion-pairs; acidic degradation; human serum; 3-methyl-1-phenyl-5-pyrazolone.

* (財)化学品検査協会東京事業所化学標準部: 131-0032
東京都墨田区東向島 4-1-1

** (財)化学品検査協会安全性評価技術研究所: 830-0023
福岡県久留米市中央町 19-14

*** 中外製薬(株): 104-0031 東京都中央区京橋 2-1-9

1 緒 言

グルクロン酸は、生体内の異物とエステル結合又は
エーテル結合して体外へ排出され、肝機能を改善するな

どの薬理作用を示すことが知られている。一般的には、グルクロン酸はグルクロノラクトンとして投与され、体内中ではその一部がグルクロン酸となりグルクロノラクトンと平衡状態にあると考えられている。又、その投与量は年齢、症状により適宜増減させる必要があり、適切な投与量及び薬理効果との濃度相関を知るために、体内におけるグルクロン酸の濃度を把握することは非常に重要である。しかし、グルクロン酸は動物の体内中にコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸などのムコ多糖の構成成分として広く分布しており、投与されたグルクロノラクトンに由来するグルクロン酸の濃度を測定するときの問題となっている。グルクロン酸の定量法としてはナフトレゾルシンによる方法^{1)~3)}、カルパゾール法⁴⁾、尿素法⁵⁾、炭酸ガス法⁶⁾、無機酸と煮沸するとき生成するフルフラールの発生率を測定する方法⁷⁾、GC による方法⁸⁾、グルクロノラクトン還元酵素を用いる酵素分析法⁹⁾等幾つもの方法が報告されている。しかし、最初の5法はすべての糖類を一括して定量する方法であるため、血清中に大量に存在するグルコース等に対して、外部から投与されたグルクロン酸の微量血中濃度を即時把握することはできない。これに対して、GC 法、酵素法はグルクロン酸を選択的に分析することが可能である。しかし、前者についてはシリル化等の複雑な前処理操作が必要であり、生成される誘導体が不安定で取り扱いが難しいこと、又後者については分析感度が不十分であるため、本研究で調べようとしているグルクロン酸の血中濃度変化を調べる方法としては不適であった。

一方、糖類の一斉分析法については糖類を発色基を有する誘導体とし HPLC 法により分析する方法が Honda ら¹⁰⁾により開発されており、この方法を利用することにより多種多様の糖類を分離定量することが可能である。しかし、グルクロン酸についてこれらの分析法を適用する場合、反応をアルカリ条件で行うためグルクロン酸が分解することや、血清中に多量に存在しているグルコースとグルクロン酸の分離を十分にしなければならないなど多くの問題点がある。そこで、本研究では最初の誘導体化操作でグルクロン酸の分解が起きないで、かつ高感度で再現性が高くなる最適の誘導体反応条件と、血清中に多量に存在するグルコース誘導体を分離分析できる最適の HPLC 条件を確立し、次に得られた分析法により実際にグルクロン酸を投与したボランティアの血中グルクロン酸の濃度変化を測定したので報告する。

2 実験

2・1 血清試料

2・1・1 分析条件検討用血清 分析条件の検討用血清として Baxter Healthcare Corporation 製の血清モニトロール・L レベル II を用いた。

2・1・2 実試料 健康な成人 16 人に、グルクロノラクトンを含んだカプセルを服用させた場合、及び同じ人にグルクロノラクトンを含まないカプセルを服用させた場合について、カプセル服用後一定時間ごとに採血して得られた血清を用いた。ここで用いたカプセル剤は、中外製薬が調製した薬剤を日本エランコ製のカプセルに充てんしたものである。

2・2 試薬

メタノール、アセトニトリル、クロロホルムは関東化学製の HPLC 用を、硫酸は関東化学製の精密分析用を、リン酸は関東化学製の特級をそれぞれ用いた。4 M 水酸化ナトリウム溶液、臭化テトラブチルアンモニウム (TBABr)、3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾロン (PMP) 及び過塩素酸ナトリウムは関東化学製をそれぞれ用いた。

グルクロン酸標準品は Aldrich 製を用いた。グルクロン酸標準液は、グルクロン酸標準品を水に溶解して調製した。

水は日本ミリボア製の Milli-RX 12 plus 及び Milli-Q SP TOC で製造された水を用いた。

2・3 装置

HPLC は、Hewlett Packard 製の HP1090 Series II (オートサンプラー付き) を、UV 検出器は HP1050 Series を使用した。A/D コンバーターは HP Interface 35900 を、システムプロセッシングユニットは HP9000 Model 300 Series を使用した。

分析用カラムは化学品検査協会製の L-column ODS (4.6 mm i.d.×150 mm) を使用した。

3 結果と考察

3・1 分析条件の検討

3・1・1 HPLC 条件の検討 グルクロン酸を PMP 誘導体として分析する場合、アセトニトリル-水混合溶液を溶離液とする通常の分析条件では、血中に大量に存在すると考えられるグルコースの誘導体が同一位置に溶出した。そのため、グルコースとグルクロン酸を分離する溶離液条件を検討した。グルクロン酸はグルコースの

Fig. 1 Relationship between reaction time of acid treatment and recovery of glucuronic acid

Fig. 2 Effect of NaOH concentration on the formation of PMP derivatives of glucuronic acid

-H 基が -COOH 基となった物質であることに注目して、溶離液を酸性にして分析するイオン抑制法とイオン化させたカルボキシル基とイオン対を作るイオン対法を検討した。その結果、イオン対法のほうが分離がよかった。次に溶離液中のリン酸緩衝液の含量を 5, 10, 20 mM に変化させた溶離液を調製し、ピーク分離度・理論段数を調べた。その結果、10 mM の場合 (5 mM TBABr:10 mM リン酸緩衝液:10 mM アセトニトリル=78:22の組成) が最適となった。又、血清中にはグルクロン酸の定量を妨害する成分がピークとして認められた。そこでこれらの保持挙動を調べるため、溶離液に塩化ナトリウムと過塩素酸ナトリウムを添加し、分離パターンを観察した。その結果、塩化ナトリウムを添加した場合はグルクロン酸ピークと妨害物質によるピークの分離が十分ではなかった。一方、過塩素酸ナトリウムを添加した場合、グルクロン酸ピークの保持時間は長くなり、妨害物質によるピークの保持時間は短くなったので、グルクロン酸と妨害物質との分離が可能になった。

3・1・2 酸分解条件の検討 グルクロン酸の一部は血清中でタンパク質等と結合するため、酸分解により遊離させる必要がある。一方、強い条件で酸分解を行うとグルクロン酸自身が分解した。そこで、酸分解の最適条件を検討した。酸分解は標準血清にグルクロン酸を添加して行った。最初に酸分解処理を行わずにグルクロン酸の添加回収試験を行ったが、グルクロン酸はほとんど回収されなかった。次に、酸分解試薬として硫酸と塩酸を検討したが、硫酸を使用する場合のほうが妨害ピークが少なかった。そこで硫酸を用いて酸濃度、反応時間及び反応温度を変化させグルクロン酸の残存率を検討した。

その結果を Fig. 1 に示した。反応温度が 60~70°C では反応時間が 6 時間までは安定であったが、反応時間を 20 時間にすると残存率は低下した。又、硫酸濃度が高いほど残存率が低下するという結果になった。そこで、グルクロン酸の残存率が 90% 以上となる条件で、しかも硫酸濃度が高くなる条件として 2 M 硫酸溶液 100 μ l を選択した。

3・1・3 PMP 化条件の検討 一般に、PMP 化反応はアルカリ条件で行われるが、アルカリ条件下ではグルクロン酸は分解され、PMP 化反応と競合する。そこで、Honda らの文献を参考にして、PMP 化反応物の生成量が最大となるアルカリ濃度 (水酸化ナトリウム濃度) と反応時間及び反応温度を検討した。その結果、反応時間は 15~45 分が、反応温度は 70°C が、水酸化ナトリウム濃度は Fig. 2 に示すように、0.2~0.6 M がそれぞれ最適であった。更に、PMP 化反応後の未反応試薬をクロロホルム抽出法で除去する最適条件を検討した。その結果、抽出する試験液の pH 値を中性にすることにより、グルクロン酸の PMP 化物ピーク付近に溶出する妨害物質を除去することができることが分かった。そこで、PMP 化反応後に酸で中和することとし、中和剤として硫酸とリン酸について検討した。その結果、リン酸を用いる場合より、0.4 M の硫酸を用いて中和した場合のほうが妨害物質のピークとの分離が良いことが確認された。なお、PMP 化物は、中性より酸性にした場合のほうが保存安定性はよかった。酸性にして 5°C の冷蔵庫内で一夜保存した場合の残存率は 80~90% で、減少はわずかであった。

3・1・4 最終測定溶液の検討 最終測定溶液を

Human serum 200 μ l

- ← Add 2 M H_2SO_4 100 μ l
- Reaction 70 $^{\circ}C$ / 4 hour
- ← Add 4 M NaOH 100 μ l

Products of degradation

- ← Add 0.5 M PMP / CH_3OH 800 μ l
- ← Add 0.4 M NaOH 400 μ l
- Reaction 70 $^{\circ}C$ / 30 min
- ← Add 0.4 M H_2SO_4 400 μ l
- ← Add CH_3Cl 2 ml
- Shake
- Centrifuge (3000 rpm / 10 min)

Water layer 200 μ l

- ← Add 20 mM H_3PO_4 • 20 mM $NaClO_4$ 200 μ l
- Reaction 40 $^{\circ}C$ / 20 min

HPLC(inject 25 μ l)

Fig. 3 Analytical procedure for detamination of glucuronic acid in human serum

HPLC 分析するとき PMP 化反応に由来する空試験ピークの形状を整えるため、最終測定溶液の溶媒組成を溶離液と同一組成とし、次に 40 $^{\circ}C$ で 20 分間の加熱処理をした。加熱処理はピーク面積の変動を抑える効果があった。加熱処理効果の理由については不明であるが、実験結果として、加熱処理をせずに HPLC 分析を行うとピーク面積は時間とともに増大し、ピーク面積が一定となるまで 3~4 時間を要したが、加熱処理を行うことによりピーク面積が一定になる時間が短くなった。

3・2 前処理及び測定方法

以上の前処理条件をまとめると次のようになる。

試料 200 μ l に 2 M 硫酸溶液 100 μ l を加えて密栓混合し、70 $^{\circ}C$ で 4 時間加温反応後、4 M 水酸化ナトリウム溶液 100 μ l を加えた。更に 0.5 M PMP-メタノール溶液 800 μ l, 0.4 M 水酸化ナトリウム溶液 400 μ l を加えて密栓混合し、70 $^{\circ}C$ で 0.5 時間加温反応させ放冷後、0.4 M 硫酸溶液 400 μ l, クロロホルム 2 ml を加えてかくはんし、3000 rpm で 10 分間遠心分離を行い妨害物質を抽出除去した。この際の上相液(水相) 200 μ l を分取し、20 mM リン酸-20 mM 過塩素酸ナトリウム混合溶液 200 μ l を加えて 40 $^{\circ}C$, 20 分間加温反応させ HPLC 分析用試料とし、その 25 μ l を HPLC へ注入した。上記の操作手順を Fig. 3 に示した。

又、Fig. 3 で前処理をした試料を Table 1 に示す条件で HPLC 分析し、次にこの方法で以下の検討を行った。

Table 1 Analytical conditions for HPLC

Column	L-column ODS (4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm)
Mobile phase	10 mM $NaClO_4$: 5 mM $(CH_3(CH_2)_3)4NBr$: 10 mM H_3PO_4 / CH_3CN = 78/22 (v/v)
Detector	UV (245 nm)
Flow rate	1.0 ml/min
Injection volume	25 μ l

Table 2 Intra-day repeatability of analysis of glucuronic acid in serum ($n=5$)

	Average of recovery, %	Standard deviation	Relative standard deviation, %
5 mg/l	88.6	4.3	4.9
20 mg/l	94.4	0.6	0.6
50 mg/l	81.5	0.9	1.1

なお、添加回収率、安定性、実試料の測定にはグルクロン酸標準液を基準とした。

3・3 標準液の検量線

0, 5, 10, 20, 50 mg/l の 5 濃度のグルクロン酸標準液を各濃度 3 本ずつ水と標準血清にそれぞれ添加し、Fig. 3 に従って処理し、分析を行った。得られたクロマトグラムよりピーク面積を求め、濃度とピーク面積との関係を調べた。その結果、両者の間には水添加検量線では相関係数 $r=0.999$ 以上、血清添加検量線では $r=0.998$ 以上のほぼ原点を通る良好な直線関係が認められ、両者の間に差はなかった。

3・4 添加回収率

検量線が直線範囲にあることを確認できた 5, 20, 50 mg/l の 3 濃度について添加回収試験を行った。回収率は標準血清にグルクロン酸を添加して Fig. 3 に従い処理したものと、Fig. 3 の PMP 化の操作から後の処理を行ったグルクロン酸標準液との比較により求めた。その結果、回収率はそれぞれ 91.3, 94.0, 81.9% であった。高濃度側では回収率が 81.9% と少し低めであったが、測定上は支障がないと考えられた。以上の結果から、0 から 50 mg/l の範囲では血清成分がグルクロン酸の PMP 化反応を阻害しないことが確認された。

更に標準血清にグルクロン酸を添加した試料について、同一日以内に各濃度 5 本ずつ調製し前処理・分析を行い日内変動を測定した。又、1 日に各濃度 1 本ずつ調

Table 3 Inter-day repeatability of analysis of glucuronic acid in serum ($n=5$)

	Average of recovery, %	Standard deviation	Relative standard deviation, %
5 mg/l	96.5	6.9	7.2
20 mg/l	88.0	4.5	5.1
50 mg/l	86.6	4.3	4.9

製し前処理・分析を行う操作を 5 日間繰り返し、日間変動を測定した。日内変動の結果を Table 2 に、日間変動の結果を Table 3 にそれぞれ示す。Table 2 及び 3 に示すとおり日内変動の相対標準偏差が 0.6~4.9%、日間変動の相対標準偏差が 4.9~7.2% と満足する結果が得られた。

更に標準血清にグルクロン酸標準液を添加した血清添加検量線を作成した。標準血清にグルクロン酸標準液 5, 20, 50 mg/l を各濃度それぞれ添加した試料について日内変動 ($n=5$)・日間変動 ($n=5$) を求めた。その結果、日内変動の相対標準偏差はそれぞれ 6.5, 0.6, 1.1%, 日間変動の相対標準偏差はそれぞれ 8.2, 6.3, 2.5% と満足する結果が得られた。

3・5 定量下限値

HPLC の検出限界値付近の 2 濃度 (2, 5 mg/l) で、前述 3・4 と同様に日内変動試験・日間変動試験を標準血清を用いて実施した。日内・日間変動の双方とも、2 mg/l 添加血清の回収率の標準偏差は 5 mg/l より 3 倍程度高い値となった。更にクロマトグラム上でも 2 mg/l 添加血清のピークは近在する妨害ピークと同等の面積値を示したため、定量下限値を 5 mg/l と設定した。

3・6 安定性

標準血清に 10 及び 50 mg/l の 2 濃度のグルクロン酸を添加した試験液について、31 日間の保存安定性試験を行った。各濃度 2 本ずつ 4 日分計 8 本を調製し -20°C で 31 日間保存し、11, 20, 31 日目にそれぞれ 2 本ずつ取り出し、Fig. 3 に従って前処理・分析してその保存安定性を調べた。その結果を Table 4 に 0 日目からの差として示す。

又、更に凍結と融解を 2 回繰り返したときの安定性を確認する試験を行った。10 及び 50 mg/l の各濃度を 4 本ずつ調製し -20°C で保存後融解し、そのうち 2 本を Fig. 3 に従って前処理・分析を行い、残りの 2 本は

Table 4 Stability of glucuronic acid at -20°C for 30 days ($n=2$)

	Deviation from the initial concentration, %		
	11 days	20 days	31 days
10 mg/l	-7.4	8.5	11.1
50 mg/l	-1.4	-0.6	11.2

Table 5 Stability of glucuronic acid during repeated freezing and thawing of serum ($n=2$, 2 times)

	Deviation from the initial concentration, %	
	1 time	2 times
10 mg/l	-8.7	-0.2
50 mg/l	-5.6	-8.0

Table 6 Demographic characteristics of the subjects

No.	Age	Sex	Hight/cm	Weight/kg
1	21	male	162.0	61.0
2	21	male	160.7	51.2
3	22	male	168.8	61.0
4	22	male	162.5	56.5
5	21	male	176.6	64.2
6	21	male	172.6	65.0
7	22	male	173.3	55.5
8	22	male	165.8	56.5
9	22	male	179.0	71.0
10	20	male	176.7	69.0
11	22	male	176.8	59.0
12	21	male	174.5	62.3
13	22	male	173.0	59.0
14	21	male	182.0	71.0
15	20	male	176.0	70.0
16	21	male	184.3	72.0

再度、 -20°C で保存後融解した後に同様の方法で分析した。その結果を Table 5 に 0 回目からの差として示す。Table 4 及び 5 からグルクロン酸は -20°C で 31 日間は安定であり、又凍結・解凍の操作を 2 回繰り返しても血清中のグルクロン酸の安定性は良好であることが確認された。

3・7 独立個体の妨害ピーク

独立した個体 (6 人) の血清 6 サンプルを Fig. 3 に

Fig. 4 Serum concentration-time profiles of glucuronic acid after single oral administration of glucuronolactone (2 g) to healthy volunteers

従って処理した。その結果、いずれも定量下限値である 5 mg/l より低い値となり、独立個体由来の妨害物質によるピークは認められず、以後の測定に支障はないものと考えられた。

3・8 実試料の測定結果

本研究で確立した分析法によりグルクロノラクトンを投与又は無投与の健康人の血清中グルクロン酸濃度を分析し、グルクロン酸の人体内での吸収と代謝を調べた。試験は健康なボランティア 16 人にグルクロノラクトン 2 g を含むカプセル剤を、又は同じ 16 人にグルクロラクトンを含まないカプセル剤を夕食・就寝後、朝、朝食をとらない状態でそれぞれ服用させた。試験は 2 期に分けて行い、ウォッシュアウト期間は 15 日とした。採血は服用後 60, 80, 100, 120, 150 分後に行った。その血液から得た血清を Fig. 3 に従って前処理・分析を行い、グルクロン酸の血清中濃度を定量した。ボランティアの背景を Table 6 に、グルクロン酸の血中濃度推移

Fig. 5 Representative HPLC chromatogram of human serum spiked with glucuronic acid

Fig. 6 Representative HPLC chromatogram of blank human serum

を Fig. 4 に、クロマトグラム例を Fig. 5 及び 6 に示す。Fig. 4 から、グルクロノラクトンを服用したときはグルクロン酸濃度が服用後 80~100 分で最高血中濃度に達し、その後排せつされていることが分かる。グルクロノラクトンを服用しないときの血清中の濃度は定量下限値以下であった。又、Fig. 5 及び 6 からグルクロン酸のピークは妨害ピークと完全に分離されており、本法が今後、血清中のグルクロン酸測定に用いることができる有用な一手法と考えられた。

文 献

- 1) B. Tollens: *Ber.*, **41**, 1788 (1908).

- 2) W. H. Fishman, S. Green: *J. Biol. Chem.*, **215**, 527 (1955).
- 3) M. Ishidate, T. Nambara: *Chem. Pharm. Bull.*, **5**, 515 (1957).
- 4) Z. Dische: *J. Biol. Chem.*, **107**, 189 (1947).
- 5) 川畑秀信, 富岡穂一, 梅野 完: 薬学雑誌, **77**, 767 (1957).
- 6) A. D. Dickson, H. Otterson, K. P. Link: *J. Am. Chem. Soc.*, **52**, 775 (1930).
- 7) 平坂義信, 助川満男: 薬学雑誌, **83**, 1073 (1963).
- 8) I. Matsunaga, T. Imanari, Z. Tamura: *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 2535 (1970).
- 9) 化学品検査協会化学品安全センター日田研究所: 試験報告書, X02-0019 (1993).
- 10) S. Honda, E. Akao, S. Suzuki, M. Okuda, K. Kakehi, J. Nakamura: *Anal. Biochem.*, **180**, 351 (1989).

要 旨

血清中のグルクロン酸をイオン対法を用いて HPLC で精度よく測定するための条件を種々検討し, 最適分析条件を確立した. 血清 200 μ l を硫酸で酸分解し水酸化ナトリウムで中和した. 更に 3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾロン (PMP)-メタノール溶液と水酸化ナトリウムを加えて PMP 化した. 次に硫酸で中和後, 未反応試薬をクロロホルムで除去し, その水相の一定量を HPLC 分析用試料とした. イオン対法を用いたことで, グルクロン酸と血液に含まれるグルコースを分離することが可能となった. 本法の検量線は 5~50 mg/l の範囲で直線性を示し, 回収率は 82~94%, 相対標準偏差は日内変動で 0.6~4.9%, 日間変動で 4.9~7.2% と良好であった. 更に -20°C で 30 日間安定, 2 回の凍結・解凍にも安定であることが確認された.