

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
109 (3) 163-167 (1989)

蛍光ラベル化剤を用いた高速液体クロマトグラフィーによる ヒト血漿中シュウ酸の高感度定量法

清水一広,* 長瀬英生, 荒木宏昌

扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター

A Highly Sensitive Assay Method of Oxalic Acid in Human Plasma Using High Performance Liquid Chromatography with Fluorescent Labeling Reagent

Kazuhiro SHIMIZU,* Hideo NAGASE, and Hiromasa ARAKI

Fuso Pharmaceutical Industries Ltd., Research and Development Center, 2-3-30,
Morinomiya, Joto-ku, Osaka, 536, Japan

(Received September 9, 1988)

An assay method for the plasma level of oxalic acid (OA) was developed by using high-performance liquid chromatography (HPLC).

Low molecular weight carboxylic acids including OA were separated from interfering plasma components by passing through ultrafilter (Centriflow® CF 25, Amicon) and a Sep-Pak® C18 cartridge (Waters), and OA was extracted with tri-*n*-butyl phosphate.

The OA in the organic layer was converted to a fluorescent substance by the esterification with 9-anthryldiazomethane (ADAM). This reaction mixture was injected into a HPLC apparatus with a fluorophotometric detector. In the experiment using standard OA, a linear relationship was obtained in concentrations ranging from 0.2 to 2.0 $\mu\text{g/ml}$. The detection limit of this method was 0.1 $\mu\text{g/ml}$, and the coefficient of variation was 2.0%.

The method developed in the present study is considered to be useful as a routine assay method for the human plasma OA level.

Keywords—HPLC; oxalic acid; human plasma; 9-anthryldiazomethane; fluorescent derivative

尿路結石の約 70% はシュウ酸カルシウムを含有している¹⁾が、その発生機序については不明な点が多い。よって結石患者の血中及び尿中シュウ酸濃度を測定することは、その発症原因及び治療法を追求する上で重要な意義を有すると考えられる。

尿中にはシュウ酸が数十から数百 $\mu\text{g/ml}$ と比較的多く含まれているため、その測定においては従来法でも特に問題は生じなかった。しかし、ヒト血中にはごく微量 (数 $\mu\text{g/ml}$ 以下) しか存在しない²⁾ため、従来から用いられてきた比色法,³⁾ 酵素法,^{4,5)} GLC 法⁶⁾ 及び RI 法⁷⁾ によっては測定が困難であり、また手技が煩雑であることからルーチンの検査法とはなり得なかった。

最近、尿中シュウ酸を蛍光ラベル化剤 (9-anthryldiazomethane: ADAM) を用いてシュウ酸のカルボキシル基と特異的にエステル結合させ、そのエステル化合物を HPLC によって分離し、蛍光検出器で測定する感度の高い方法が報告された。⁸⁾ しかし、この報告においては、血中のシュウ酸量が微量であり、かつ ADAM が血中の他の物質と反応すること等のため測定できず、測定法の改良の必要性を認めていた。

今回、著者らは ADAM と反応すると思われる血液中的カルボキシル基を有する脂質及び低極性物質をカートリッジ式逆相カラムを用いて選択的に除去する前処理を施すことにより、高感度かつ再現性のよい、ルーチンな測定法に適した方法を考案した。

実 験 の 部

試薬及び試料 シュウ酸二水和物及びトリ-*n*-ブチルホスフェートはキンダ化学製特級を、ADAM はフナコ

シ製を用いた。メタノール及びアセトンは林純薬製高純度試薬を用いた。その他の試薬は市販の特級及び HPLC 用を使用した。

試料は健康人の血漿を使用した。

装置及び HPLC 測定条件 島津製作所製の高速液体クロマトグラフ, LC-3A 型, 蛍光検出器 RF-530 型及び記録計 R-111 型を使用した。Sep-Pak® C18 カートリッジ (Waters) は、使用前にメタノール 3 ml 及び水 5 ml を通して洗浄した。

カラムは逆相系の Nucleosil 5C8 (Nagel, 4.6 mm i.d.×25 cm), 移動相にアセトニトリル-水 (7:3) を用い、流速は 1.0 ml/min とした。蛍光検出は励起波長 254 nm, 測定波長 412 nm で行った。

試料液の調製及び定量 ヒト血漿 2 ml をセントリフロー® CF-25 (アミコン) を用いて限外ろ過 (1000×g, 30 min) し、ろ液 1 ml に 7% NaHCO₃ 溶液 10 µl を加えて pH を 8.0—8.5 に調整した。この溶液を Sep-Pak® C18 カートリッジに通し、通過液をガラス製共栓試験管 (8 mm i.d.×8 cm) に採取し、6 M HCl 20 µl を加えて酸性 (pH 1.0—2.0) にした後、トリ-*n*-ブチルホスフェート 0.5 ml を加え、振とう機にて 3 分間抽出した。遠心分離 (1000×g, 10 min) 後、上層 0.3 ml を別の褐色試験管に取り、メタノール 0.2 ml, ADAM 溶液 (3 mg/ml アセトン溶液: 用時調製) 0.1 ml を加え、室温で約 2 時間反応させた。別にシュウ酸標準液 (0.2, 0.5, 1.0, 2.0 µg/ml) 1 ml を同様に操作し、反応液 5 µl を高速液体クロマトグラフに注入し、そのピーク高による絶対検量線法を用いて定量した。

結 果 と 考 察

Sep-Pak® C18 カートリッジによるクリーンアップ条件の検討

ADAM 試薬はカルボキシル基と特異的にエステル結合し蛍光を発する。よって、血漿中シュウ酸と ADAM との反応率を高めるためには、血漿中の他のカルボキシル基を有する物質 (脂肪、脂肪酸等の脂質及びアミノ酸) をあらかじめ除去しておくことが必要である。

Sep-Pak® C18 カートリッジには低極性の µBondapak® C18 が充填されており、これに血漿除タンパク液を通すことで、血漿中の脂質類や中・低極性物質は吸着され、シュウ酸等の水溶性物質が通過すると考えられる。まず、シュウ酸標準液 (1 µg/ml, pH 3.5) を Sep-Pak® C18 カートリッジに通して回収率を求めたところ、約 65% であった。そこでシュウ酸標準液の pH を 7% NaHCO₃ 溶液で 4.0, 6.0, 8.0 及び 9.0 に調整し、カートリッジに通して回収率を求めたところ、pH 8.0 においてほぼ 100% 回収された。ついで、血漿除タンパク液を 7% NaHCO₃ 溶液を用いて pH 8.0 付近に調整した後、Sep-Pak® C18 カートリッジに通し、ADAM と反応させ、HPLC で分析したところ、Sep-Pak® C18 カートリッジ通過液中には脂質類が含まれないため夾雑ピークは消失し、ADAM とシュウ酸との反応生成物のピークがよく分離された (Fig. 1)。

HPLC 分析条件の検討

Imaoka ら⁸⁾ の方法に準じてシュウ酸と ADAM とのジエステル化合物を合成した。この化合物は非常に極性が低いため、逆相系カラム Richrosorb® RP18 (Merck) を使用し、種々の移動相を用いて検討したが、カラムからの溶出は困難であった。

次に、中極性充填剤カラムの Nucleosil® 5C8 を用いて、移動相にアセトニトリル-水系を用いて検討した結果、アセトニトリル-水 (7:3) 混液が ADAM 試薬及び試薬分解物のピークとシュウ酸ジエステルピークとを良好に分離した。更に、血漿について同様に分析した結果、血漿中の低級カルボン酸との反応生成物とシュウ酸ジエステルとは良好に分離した。

なお、この化合物のアセトニトリル-水 (7:3) 中における励起極大波長は 254 nm, 蛍光極大波長は 412 nm であったので、この条件で検出を行った。

反応条件の検討

ADAM とシュウ酸とのエステル化反応に影響を及ぼす第一の要因は反応溶媒である。

反応溶媒はメタノール又は酢酸エチルが最適⁹⁾ で、含水すると反応性が低下する。よって血中からシュウ酸を分離し、完全にメタノールに溶解する方法を試みたが、エバポレートによりシュウ酸が分解し、この方法は不適当と判断した。次に、Imaoka ら⁸⁾ の方法に準じて除タンパク血漿中からシュウ酸をトリ-*n*-ブチルホスフェートで抽出し、ADAM と反応させる方法を試みたがこの溶媒中では反応速度が遅く、また反応率も低かった。その

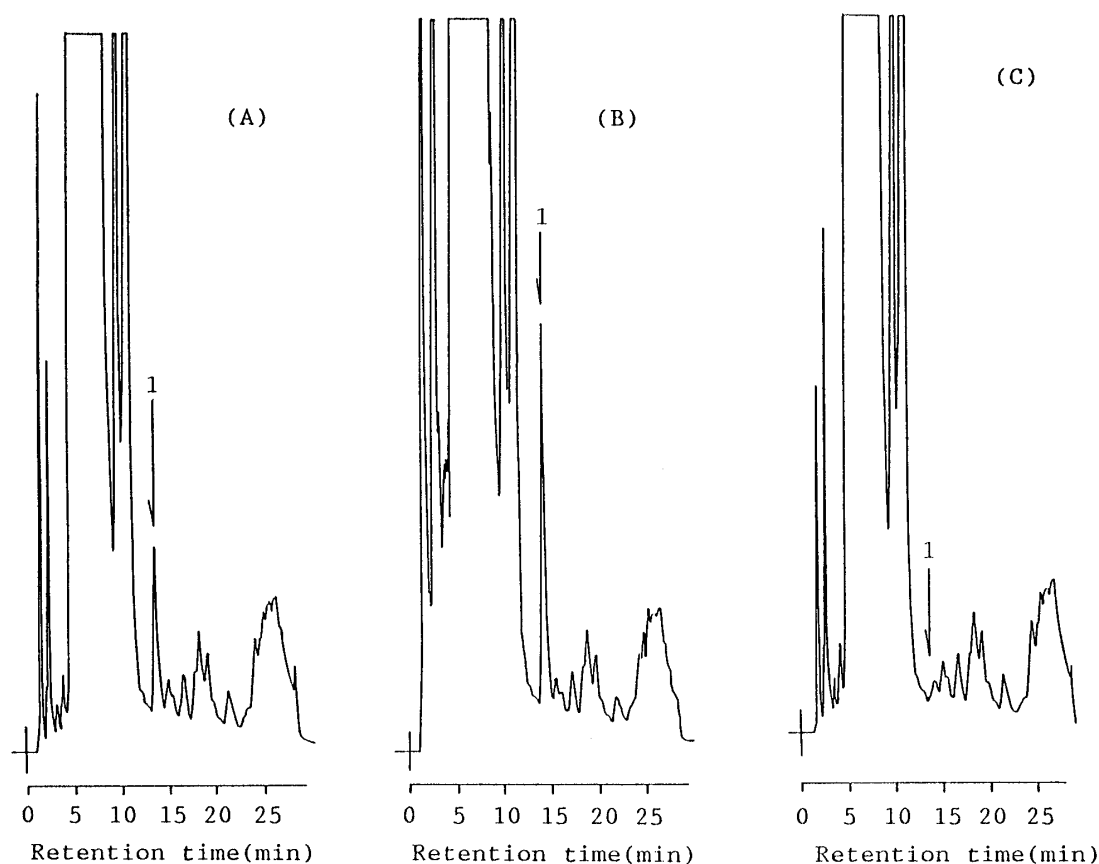


Fig. 1. Chromatograms of Human Plasma (A), Human Plasma Added with Oxalic Acid (0.5 $\mu\text{g/ml}$) (B) and Human Plasma Treated with Oxalate Oxidase (C)

Peak 1; di-9-methylanthracenyl oxalate. HPLC condition is given in the text.

ためトリ-*n*-ブチルホスフェート中でのシュウ酸と ADAM との反応を高めるためにメタノール、酢酸エチル、エタノール及びアセトニトリルの添加による影響について検討した。その結果、メタノールの添加による反応率が最も高く、かつ反応速度も増加することが明らかとなり、メタノール添加量 30% の時が最大の反応を示した (Fig. 2, A)。

第二の要因は ADAM 試薬の濃度である。Imaoka ら⁸⁾ の尿中シュウ酸定量法では高濃度の ADAM 試薬 (0.63%) を使用しており、この条件では妨害ピークが多く出現し、血液中の微量のシュウ酸の定量には応用できないため、血漿シュウ酸レベルに対する ADAM 添加量 (最終濃度, 0.01—0.1 w/v%) について検討を加えた。その結果、ADAM 0.05 w/v% (シュウ酸に対するモル比約 200 倍) 以上で最大の反応が得られた (Fig. 2, B)。以上の結果から、ADAM 試薬に含有する不純物及び分解等によって生じる妨害ピークを極力小さくすることを考慮に入れて、ADAM 添加量を 0.05 w/v% とした。

ついで反応時間について検討した。エステル化反応は室温で 1.5—2.5 時間で一定のピーク高を示した (Fig. 2, C)。よって、エステル化反応時間は室温で 2 時間とした。

血液中のシュウ酸ジエステル化合物の同定

血漿中シュウ酸の同定はヒト血漿をシュウ酸酸化酵素で処理することにより行った。すなわち、ヒト血漿を限外ろ過にて除タンパク後、2 本の試験管に分けて、一方にシュウ酸酸化酵素 (ペーリンガー・マンハイム) 50 μl (0.56 U/ml) を加え 37°C, 30 分間反応させた。他方には水 50 μl を加え、同様に操作し、分析した。その結果、Fig. 1 に示したごとく、シュウ酸酸化酵素処理試料については、シュウ酸が酵素により酸化されたため、シュウ酸ジエステル化合物のものと想定されるピークが消失した。更にヒト血漿に対してシュウ酸標準液 1.0 $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$ を添加後反応させ、分析した結果、Fig. 1 に示したごとく血漿中シュウ酸の反応生成物シュウ酸ジエステル化合

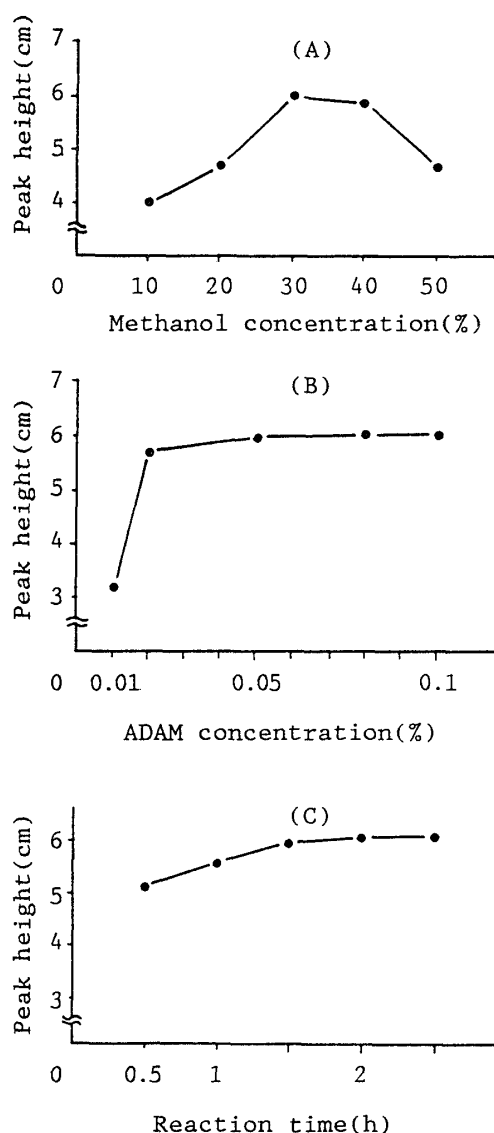


Fig. 2. Effect of Methanol Concentration (A), ADAM Concentration (B) and Reaction Time (C) on Production of Di-9-methylantracenyl Oxalate

物と想定されるピークに添加したシュウ酸の反応生成物のピークが重なりピーク高は増大した。以上、2 試験のデータから保持時間約 14 分のピークは血漿中シュウ酸ジエステル化合物と確認された。

添加回収率

血漿 2 ml にシュウ酸 0.4—2.0 μg を添加し、上記反応条件で反応させ、前記測定条件における回収率を求めた。Table I に示したごとく 98.34—100.0% と良好な結果が得られた。

検量線

シュウ酸標準液の濃度 0.2—2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と反応生成物のピーク高の間に直線性が得られた ($X=0.1855Y-0.5994$)。検出限界は 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 血漿であり、本定量法の変動係数は 0.2—2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度範囲で 0.59—2.43% ($n=4$) と良好であった。

TABLE I. Recoveries of Oxalic Acid Added to Human Plasma (1 ml)

Added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)	C.V.
None	1.12 1.18 1.16 1.13	(1.15 \pm 0.028)	—
0.2	1.33 1.34 1.32 1.36	(1.34 \pm 0.017)	99.08 \pm 1.26
0.5	1.62 1.63 1.63 1.61	(1.62 \pm 0.010)	98.34 \pm 0.58
1.0	2.18 2.15 2.16 2.11	(2.15 \pm 0.029)	100.00 \pm 1.37

$\bar{X} \pm \text{S.D.}$

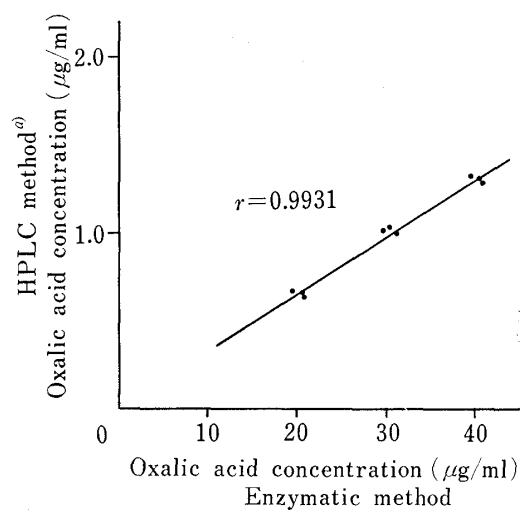


Fig. 3. Relationship between Proposed HPLC Method and Enzymatic Method in Oxalic Acid Concentration

a) Sample solutions used for enzymatic method were diluted by 30 times.

本法と酵素法との相関性

尿及び食物中に含有されるシュウ酸の分析に汎用されている酵素法¹⁰⁾と本法との相関性について検討した。

酵素法は検出感度が低いため、血漿にシュウ酸を 20, 30 及び 40 $\mu\text{g/ml}$ になるように加え、その一部を酵素法により残りを蒸留水で 30 倍に希釈して本法により定量した。その結果、本法と酵素法には $Y=1/30(0.95X+0.57)$, $r=0.9931$ と良好な相関性が得られた (Fig. 3)。

結 語

本研究より以下の結論を得た。

- (1) 血漿中シュウ酸を 0.2—2.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲 (検出限界 0.1 $\mu\text{g/ml}$) で良好な直線性と再現性をもって検出した。
- (2) 添加回収率及び本法と酵素法との相関性は良好であった。
- (3) 本定量法は、従来の血中シュウ酸定量法と比較して、簡便かつ高感度な測定法であると考えられる。

引 用 文 献

- 1) 保科 彰, 泌尿紀要, **30**, 1405 (1984).
- 2) P. Boer, L. van Leersum, H. J. Endeman, *Clin. Chim. Acta*, **137**, 53 (1984).
- 3) P. G. L. C. Krugers Dagneaux, J. T. Klein Elhorst, F. M. F. G. Olthuis, *Clin. Chim. Acta*, **71**, 319 (1976).
- 4) G. Kohlbecker, M. Butz, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **19**, 1103 (1981).
- 5) U. Rehmert, K. Wicher, W. Ruge, J. Bahlmann, *Lab. Med.*, **7**, 29 (1983).
- 6) M. Yanagawa, H. Ohkawa, S. Tada, *J. Urol.*, **129**, 1163 (1983).
- 7) D. J. Bennett, F. E. Cole, E. D. Frohlich, D. T. Erwin, *Clin. Chem.*, **25**, 1810 (1979).
- 8) S. Imaoka, Y. Fune, T. Sugimoto, N. Hayahara, M. Maekawa, *Anal. Biochem.*, **128**, 459 (1983).
- 9) 植田季弘, 林 守正, 石田泰夫, 有末一隆, 甲田一馬, 林 長蔵, 臨床化学シンポジウム, **21**, 39 (1981).
- 10) J. William, "Method of Enzymatic Analysis," ed. by H.U. Bergmeyer, Academic Press Inc., New York, 1974, p. 1542.