

高速液体クロマトグラフィーによる尿中蓚酸測定法について

大阪市立大学医学部泌尿器科学教室（主任：前川正信教授）

杉 本 俊 門

西 尾 正 一

前 川 正 信

大阪鉄道病院泌尿器科（主任：早原信行博士）

早 原 信 行

大阪市立大学医学部化学研究室（主任：船江良彦助教授）

今 岡 進

船 江 良 彦

A NEW METHOD TO ASSAY URINARY OXALIC ACID USING
HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Toshikado SUGIMOTO, Shoichi NISHIO and Masanobu MAEKAWA

*From the Department of Urology, Osaka City University Medical School**(Director: Prof. M. Maekawa, M.D.)*

Nobuyuki HAYAHARA

*From the Department of Urology, Osaka Hospital of Japanese National Railways**(Chief: N. Hayahara, M.D.)*

Susumu IMAOKA and Yoshihiko FUNAE

*From the Laboratory of Chemistry, Osaka City University Medical School**(Director: Y. Funae, M.D.)*

Measurement of oxalic acid in urine has an important clinical significance because approximately 70% of human urinary calculi are composed of calcium oxalate. Different analytical methods of oxalic acid have been reported, but most are unsuitable for clinical use. Thus we developed a new method to assay oxalic acid in urine using high-performance liquid chromatography (HPLC). This acid was extracted from urine with tri-*n*-butyl phosphate and converted into the fluorescent derivative by esterification with 9-anthryldiazomethane (ADAM). The reaction mixture containing the oxalic acid derivative can be directly chromatographed on HPLC using an ODS reverse phase type column monitored with a fluorophotometric detector. A linear relationship was observed from 1 to 100 $\mu\text{g/ml}$ of standard oxalic acid dissolved in saline. Healthy adults excrete 23.8 ± 9.0 mg (mean $\pm$ SD) of oxalic acid per day.

This method should prove valuable for routine measurement of urinary oxalic acid as it is accurate, simple and specific.

Key words: Oxalate, High-performance liquid chromatography, Fluorescent derivative

緒 言

尿路結石症の病因は多岐にわたり、しかもいまだ不明な点も多い。尿路結石の構成成分のうち、尿酸カルシウムは約70%を占め¹⁾、尿路結石症患者の尿中尿酸排泄量を測定することは、その原因を追求する上で非常に重要なことと考えられる。しかし、尿中尿酸を正確に測定することは、かなり困難なことである。過去、尿酸の測定法に関しては、多くの報告²⁻⁹⁾があるが、いまだ臨床的に応用できる方法は開発されていない。最近、高速液体クロマトグラフィー (High-performance liquid chromatography, 以下 HPLC) の利用により、脂肪酸などの低分子物質を微量の検体で正確に測定できるようになった^{10,11)}。しかし、紫外線検出器を用いる方法では、カルボン酸そのものは発色団を有していないために感度が低く、また、210 nm 以下の波長での検出においては、ほかの物質との選択性に乏しい。正常人の尿中尿酸濃度は、5~30 µg/ml 程度と非常に低濃度であり、紫外線検出器による測定法は適さないと思われる。そこで、尿酸を強い発色団を有する物質に誘導する必要がある。われわれは、尿中尿酸を測定するにあたり、脂肪酸と特異的にエステル結合し、しかも強い蛍光性を持つ 9-anthryldiazomethane (ADAM) を用いた。すなわち、尿酸と ADAM のエステル化合物を HPLC によって分離し、蛍光検出器によって測定する方法を試みた。その結果、この新しい測定法は、臨床応用が可能と考えられたので報告する。

実験方法

試薬は、9-anthryldiazomethane (ADAM) (フナコシ薬品)、tri-n-butyl phosphate (和光純薬)、 $H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$ (和光純薬)、液体クロマトグラフ用 acetonitrile (和光純薬) を使用し、ほかの試薬は通常の方法で用いた。HPLC 装置は、カラムに TOKO SODA LS410K (逆相タイプ)、ポンプに TOKO SODA SP-8700、試料注入器に Rheodyne Model 7215、蛍光検出器に Shimadzu RF-530、データ処理器に Shimadzu C-R1A を使用した。

測定方法の手順を Fig. 1 に示す。試験管に 0.5 ml の尿をとり、2N-HCl 0.05 ml と 0.5 ml の tri-n-butyl phosphate を加え、2分間激しく攪拌する。さらに、3,000 回転で10分間遠心分離し、上層の有機層より 0.2 ml を採取し、これに 0.2 ml の methanol と 0.4 ml の ADAM の acetone 溶液 (6.3 mg/ml) を室温で加える。2時間室温放置後、15 µl を HPLC 装置に注

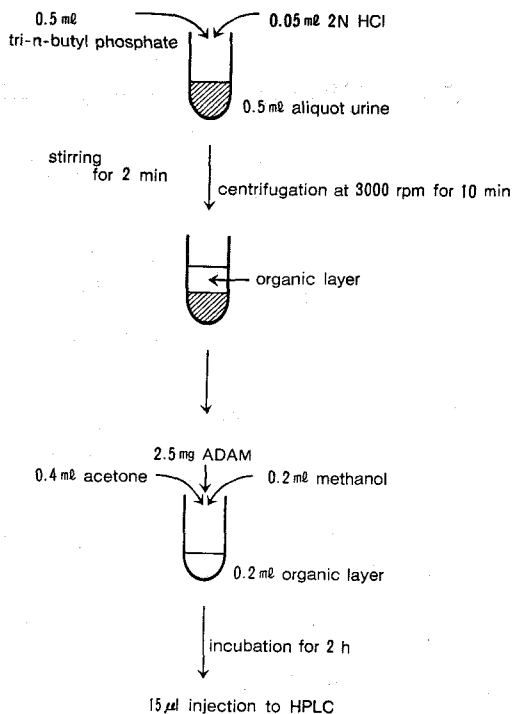


Fig. 1. Procedure of determination of oxalic acid

入する。HPLC の条件は、移動相に CH_3CN-H_2O (75:25) 溶液を用い、流速 1.7 ml/min、圧力 140 kg/cm² である。また、蛍光検出は、励起波長 254 nm を用い、検出波長 410 nm にておこなった。尿酸の定量は、データ処理器でピーク面積を算出することによっておこなった。尿検体は、24時間蓄尿の一部を用い、対象症例としては、非尿路結石症患者20例を選び、24時間尿中尿酸排泄量を算出した。蓄尿に際しては、蓄尿容器に防腐剤などの使用は避けた。

結 果

1. di-9-methylanthracenyl oxalate の同定

尿酸 5 mg を methanol 3 ml に溶解し、これに ADAM の acetone 溶液 (6.3 mg/ml) を加えた。0°C で1時間放置したのち、析出した結晶を濾取し、chloroform から再結晶して淡黄色の針状結晶をえた。この結晶が尿酸に ADAM 分子2個の結合した diester (di-9-methylanthracenyl oxalate) であることは、FD-MS で m/z 470 に分子イオンピークを示すことからあきらかとなった。

2. クロマトグラム

Fig. 2~4 は、それぞれ尿酸の diester の標準品、非尿路結石症患者の尿、および、その尿から硫酸カルシ

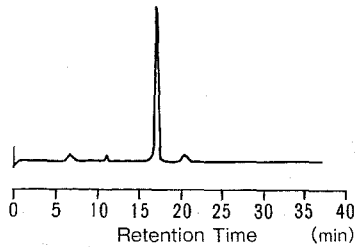


Fig. 2. Chromatogram of standard synthesized di-9-methylanthracenyl oxalate

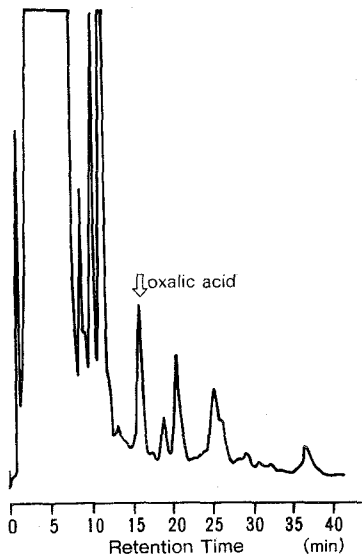


Fig. 3. Chromatogram of normal urine

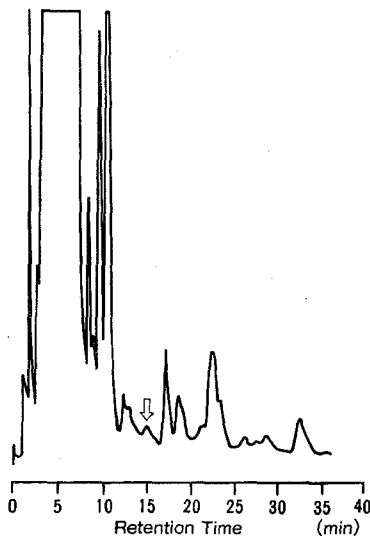


Fig. 4. Chromatogram of urine from which oxalic acid was removed

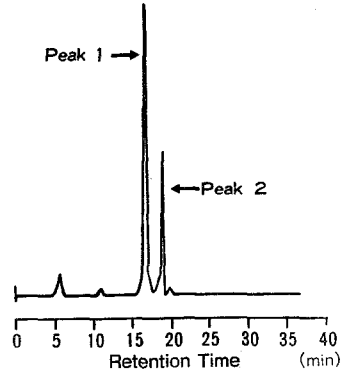


Fig. 5. Separation of di-9-methylanthracenyl oxalate and malonate. Peak 1 and 2 indicate oxalate and malonate, respectively

ウム処理にて尿酸を除去した場合のクロマトグラムである。di-9-methylanthracenyl oxalate の溶出時間は16分であり、それより早期に出現するピークの大部分は、ADAM の分解物である。しかし、Fig. 4 で示すように、di-9-methylanthracenyl oxalate のピークとADAM の微量の分解物のピークが重複する。Fig. 5 は、尿酸とマロン酸の混合物のクロマトグラムであるが、両者のピークは明瞭に分離された。

3. 標準曲線

尿酸濃度とデータ処理器によって算出された peak area の間には、尿酸濃度が 1~100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲では、高い相関 ($r=0.999$) が認められた (Fig. 6)。この標準曲線は、室温やサンプル調製後 HPLC へ注入

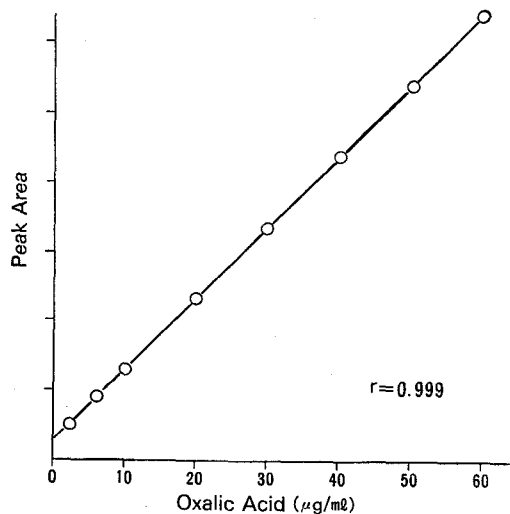


Fig. 6. Standard curve of oxalic acid

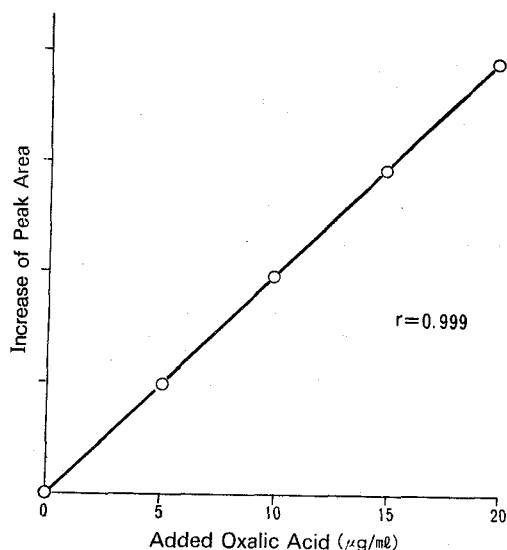


Fig. 7. Relationship between increase of peak area and added oxalic acid to urine sample

までの時間（ただし、10時間以内）には、ほとんど影響を受けず、安定した再現性がえられた。しかし、

100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では、直線性は失われ、peak area は低下傾向にあった。また、前述したように、ADAM の分解物の一部と di-9-methylanthracenyl oxalate の溶出時間が接近しており、1 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度では定量が不正確であった。この理由から、標準曲線は原点を通過しなかった。

4. 尿中蓚酸添加の回収率

同一尿検体に、5, 10, 15, 20 μg の蓚酸を添加し、それぞれの定量をおこなった。蓚酸添加量と peak area の増加量の間には、高い相関 ($r=0.999$) が認められ、回収率は 95~105% であった (Fig. 7)。さらに 1~5 μg の蓚酸添加の場合でも回収率は 90~110% と満足すべき結果を得た。したがって、調製したサンプル中には、この測定を妨害するような物質は存在しないと考えられた。

5. 同一尿検体の複数測定

2 種類の尿検体をそれぞれ 5 回測定し、平均値と標準偏差から変動係数を求めた (Table 1)。変動係数は、それぞれ 5.8%, 3.8% であり、この測定法の再現性は非常に良好であった。

Table 1. Investigation of reproducibility

Sample No.	Oxalic acid ($\mu\text{g/ml}$)					Mean $\pm$ SD	CV (%)
	1	2	3	4	5		
1	25.6	22.6	23.5	23.4	25.7	24.2 $\pm$ 1.4	5.8
2	23.6	22.1	23.3	24.2	24.3	23.5 $\pm$ 0.9	3.8

CV: Coefficient of variation

6. 比色検定法との比較

今回の測定法と蓚酸のヒドラゾン化による比色検定法⁹⁾の両測定法で、非尿路結石症患者 20 症例の尿検体を定量した。二者間の尿中蓚酸濃度の相関係数は 0.881 であり、有意の相関 ($p < 0.01$) を認めた (Fig. 8)。

7. 非尿路結石症患者の24時間蓚酸排泄量

大阪市立大学医学部泌尿器科および大阪鉄道病院泌尿器科に入院した非尿路結石症患者 20 症例の24時間尿について、蓚酸排泄量を測定した結果 $23.8 \pm 9.0 \text{ mg/day}$ (Mean $\pm$ S.D.) であった。

考 察

蓚酸の測定法としては、混雑物と分離するために蓚酸を沈澱物として分離するか、ether によって抽出し

たのち、過マンガン酸カリウム滴定によって定量する方法²⁻⁴⁾が最初のものであった。しかし、ether によって尿中から完全に蓚酸を抽出するには、18 時間を要し、また、過マンガン酸カリウム滴定は特異性に乏しく、感度も低い。そのうち、isotope dilution method⁵⁾、比色検定法^{6,9)}、enzyme method⁷⁾ や gas chromatography⁸⁾ を用いる方法などが報告されている。しかし、いずれの方法も操作手順の簡便さ、正確さ、費用の点などのすべてを満足させるものとはいいがたい。

最近、われわれの方法と同様に HPLC を用いて蓚酸を測定する方法^{12,13)}が報告されている。これらの方法は、蓚酸を紫外線吸収を有する化合物でラベル化したのち、HPLC で分離定量する方法であるが、紫外線検出による方法では、蛍光検出によるものに比し、感度が低く、特異性に乏しい。1980年、木下ら¹⁴⁾

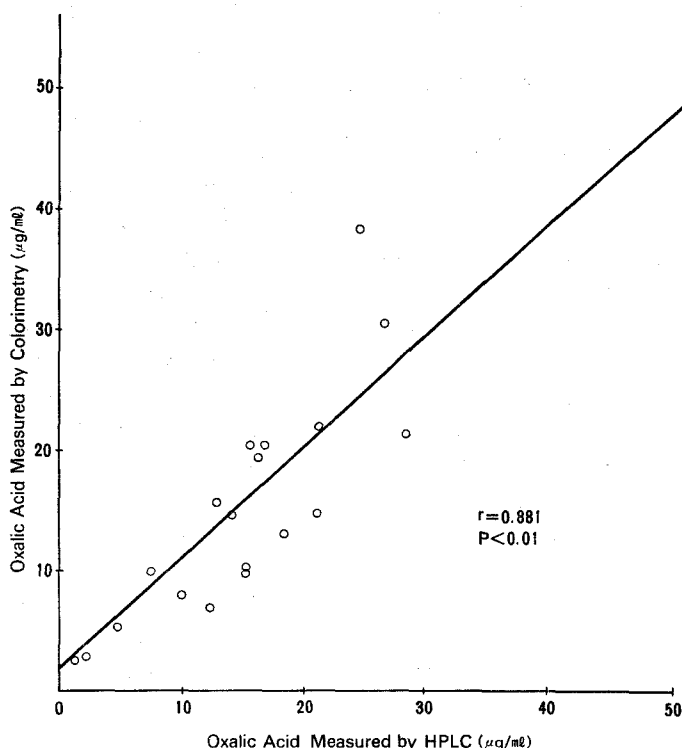


Fig. 8. Correlation between the values obtained by HPLC and by the colorimetric method

は、脂肪酸の蛍光ラベル化剤として 9-anthryldiazomethane (ADAM) を開発した。生理食塩水中で蓚酸と ADAM を反応させると、反応は遅く、monoester が生成した。しかし、この 2 つの物質を有機溶媒中で反応させると、すみやかに diester が生成した。したがって、尿中から有機溶媒を用いて蓚酸を抽出する必要があった。われわれは、蓚酸の抽出には tri-n-butyl phosphate を用いた。これは、ether に比し、蓚酸の分配係数ははるかに大きく、蓚酸を短時間で効率よく抽出できるからである。さらに、抽出によりアミノ酸などの水溶性物質を除去できる。ADAM は、tri-n-butyl phosphate 中において蓚酸とすみやかに反応する。しかし、ADAM を acetone 溶液にして反応させたところ、acetone は極性が低いために、蓚酸と ADAM の反応は遅延した。したがって、反応時間を短縮するために methanol を添加した。このようにして、蓚酸抽出後そのまま ADAM と反応させ、また、反応液を直接 HPLC 装置に注入し、蛍光検出によって di-9-methylanthracenyl oxalate の量を測定できるようになり、蓚酸の定量は簡便かつ短時間で施行できるようになった。

HPLC 装置にサンプル注入後、ADAM やその分

解物は早期に溶出される。マロン酸と蓚酸の溶出時間は接近しているが (Fig. 5)、分離可能であり、また、マロン酸より長鎖の dicarboxylic acid や monocarboxylic acid とは完全に分離される。リンゴ酸や馬尿酸のような親水性の carboxylic acid は溶出時間が短く、ADAM やその分解物と同程度の時間で溶出される。そのほか、Lawson¹⁶⁾ が報告しているような正常人尿で一般に認められるおもな有機酸についても検討したが、蓚酸と同時間に溶出される有機酸は存在しなかった。また、このことは、尿中蓚酸を硫酸カルシウム処理にて除去した場合のクロマトグラムにおいて、蓚酸の溶出時間 (16 分) に、ピークが認められないことにより証明される (Fig. 4)。

今回の測定方法は、標準曲線の信頼性が非常に高く (Fig. 5)、また、同一検体の複数測定においても再現性は良好であった (Table 1)。さらに、尿中より蓚酸の抽出も完全であったため、サンプル内に内部基準となる物質を添加する必要はないと考えた。

非尿路結石症患者 20 例における 24 時間尿中蓚酸排泄量を測定した結果は、 23.8 ± 9.0 mg/day (Mean $\pm$ S.D.) であり、9.3~41.2 mg/day の範囲であった。この値は、過去の報告より若干低値ながら、比色法によ

る測定値ともよく相関しており、ほぼ満足できる結果であった。

われわれが新しく開発した尿中尿酸測定法は、特異性および感度が高く、かつ、操作手順が簡便である。ADAM の分解物のうち、溶出時間が di-9-methylanthracenyl oxalate と近接するものがあるが、HPLC 条件のうち移動相をさらに検討することでこの二者の分離が可能になれば、尿中よりはるかに微量な血中尿酸の測定にも応用できると考える。

結 語

尿中尿酸を蛍光物質でラベル化し、逆相タイプのカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー法によって定量する新しい測定法を開発した。この測定方法は、特異性および感度が高く、回収率と再現性は満足すべきものであった。また、検出限界は $1\sim 100\text{ }\mu\text{g/ml}$ で、低濃度の尿酸の測定も可能であった。非尿路結石症患者20例の24時間尿中尿酸排泄量は、 $23.8\pm 9.0\text{ mg/day}$ (Mean $\pm$ S.D.) であった。今後、尿路結石症患者の尿中尿酸排泄量を検討するとともに、この方法を改良して、血中尿酸の測定もおこないたいと考える。

なお、本論文の要旨は、第32回日本泌尿器科学会中部連合地方会において発表した。

文 献

- 1) Wax SH and Frank IN: A retrospective study of upper urinary tract calculi. *J Urol* **94**: 28~32, 1965
- 2) Powers HH and Levatin PJ: A method for the determination of oxalic acid in urine. *J Biol Chem* **154**: 207~214, 1944
- 3) Yarbrow CL and Simpson RE: The determination of total urinary oxalate. *J Lab Clin Med* **48**: 304~310, 1965
- 4) Hodgkinson A and Zarembski PM: The determination of oxalic acid in urine. *Analyst* **86**: 16~21, 1961
- 5) Koch GH and Strong FM: Determination of oxalate in urine. *Anal Biochem* **27**: 162~171, 1969
- 6) Hodgkinson A and Williams A: An improved colorimetric procedure for urine oxalate. *Clin Chim Acta* **36**: 127~132, 1972
- 7) Hallson PC and Rose GA: A simplified and rapid enzymatic method for determination of urinary oxalate. *Clin Chim Acta* **55**: 29~39, 1974
- 8) Wolthers BG and Hayer M: The determination of oxalic acid in plasma and urine by means of capillary gas chromatography. *Clin Chim Acta* **120**: 87~102, 1982
- 9) 八竹 直・古武敏彦・西井易穂・清水トシ子: 尿中尿酸に関する検討: 第1報, 尿中尿酸の新しい測定法について. *日泌尿会誌* **70**: 286~290, 1979
- 10) Libert B: Rapid determination of oxalic acid by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **210**: 540~543, 1981
- 11) Mayer WJ, McCarthy JP and Greenberg MS: The determination of oxalic acid in urine by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr Sci* **17**: 656~660, 1979
- 12) Hughes H, Hagen L and Sutton RAL: Determination of urinary oxalate by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **119**: 1~3, 1982
- 13) Murray JF, Nolen HW, Gordon GR and Peters JH: The measurement of urinary oxalic acid by derivatization coupled with liquid chromatography. *Anal Biochem* **121**: 301~309, 1982
- 14) Nimura N and Kinoshita T: Fluorescent labeling of fatty acids with 9-anthryldiazomethane(ADA M) for high performance liquid chromatography. *Anal Lett* **13**: 191~202, 1980
- 15) Zarembski PM and Hodgkinson A: The fluorimetric determination of oxalic acid in blood and other biological materials. *Biochem J* **96**: 717~721, 1965
- 16) Lawson AM, Chalmers RA and Watts RW: Urinary organic acids in man. 1. Normal patterns. *Clin Chem* **22**: 1283~1287, 1976

(1982年10月22日受付)