

イオンクロマトグラフィーによる尿中陰イオンの分析

The Analysis of Urinary Anions by Ion Chromatography

(2001年3月31日受理)

嶋田 義弘

Yoshihiro Shimada

Key words : イオンクロマトグラフィー Ion chromatography, 尿 Urine, 陰イオン Anion,
生物学的モニタリング Biological monitoring

Abstract

The possibility of biological monitoring by determining urinary anions was investigated using ion chromatography. The following results were obtained.

1. The simple determination of urinary anions became possible by ion chromatography.
2. The limits of detection for chloride, nitrate, phosphate, sulfate and oxalic acid were 0.202 $\mu\text{g/ml}$, 0.256 $\mu\text{g/ml}$, 0.087 $\mu\text{g/ml}$, 0.237 $\mu\text{g/ml}$ and 0.025 $\mu\text{g/ml}$, respectively.
3. The amounts of urinary excretion of nitrate, phosphate and sulfate were increased in the 3 - 4 hours after a meal.
4. Measurement of the amount of urinary excretion for each experimental time resulted in an excellent correlation between phosphate and sulfate ($r=0.8667$, $p<0.01$).

緒 言

筆者はこれまでに生物学的モニタリングの一環として、トルエン暴露後の体内摂取量の推定方法のために、その尿中代謝産物である馬尿酸の高速液体クロマトグラフィーによる測定¹⁾、モノクロロベンゼン暴露の指標としてのp-クロロフェニルメルカプツール酸の測定²⁾、またビタミンC³⁾およびビタミンB₂⁴⁾の摂取量のモニタリングとして尿中排泄量を高速液体クロマトグラフィーにより測定するなど、尿中排泄物による摂取量のモニタリングについて報告してきた。また一方、野菜中に含まれる硝酸、シュウ酸をイオンクロマトグラフィーにより測定してきた⁵⁾。そこで今回、イオンクロマトグラフィーによる簡便な測定方法により、尿中に排泄されてくる陰イオン成分であ

る塩化物イオン (Cl^-)、硝酸イオン (NO_3^-)、リン酸イオン (PO_4^{3-})、硫酸イオン (SO_4^{2-}) 及びシュウ酸について、その分析の可能性および意義を検討した。

方 法

試料尿：男性（47歳）の日常生活における尿を、2時間おきに採尿した。

測 定：試料尿を3,000rpmで15分間遠心分離し、上澄みを水で100~1000倍に希釈後フィルター（DISMIC-13 Cellulose Acetate 0.20 μm , ADVANTEC）でろ過してからイオンクロマトグラフィーに注入した。装置はDionex 2000i/SP, カラムはDionex HPIC-AS4A, カラムオープン温度25 $^{\circ}\text{C}$, 溶離液は1.8mM Na_2CO_3 +1.7mM NaHCO_3 , サプレッサーはAMMSアニオンメンブランサプレッサー, 再生液0.025N H_2SO_4 , 検出は電気伝導度検出器（Dionex）, 流速は1.5ml/min., 注入量は50 μl で行った。定量はクロマトコーダー12によりピーク面積によって行った。

結 果

尿のクロマトグラムをFig. 1に示した。各成分のリテンションタイムは、塩化物イオンが1.8分、硝酸イオンが3.2分、リン酸イオンが4.3分、硫酸イオンが5.5分、シュウ酸が7.2分であり、それぞれ良好な分離のピークが得られた。

各物質の検量線をFig. 2に示した。またこの検量線から、ブランク信号にブランクの標準偏差の3倍を加えたものに等しい信号を与える分析種濃度とした場合の各物質の検出限界を求めると、塩化物イオンが0.202 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 硝酸イオンが0.256 $\mu\text{g}/\text{ml}$, リン酸イオンが0.087 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 硫酸イオンが0.237 $\mu\text{g}/\text{ml}$, シュウ酸が0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

日常生活における各物質の尿中への排泄量を、2時間毎に測定した結果をFig. 3に示した。塩化物イオン以外は早朝1番の尿中排泄が最も多く、2時間後の2回目の尿では大きく下がりその後は増減をしながら推移した。塩化物イオンは3回目の尿で最大値を示したが、全体的には徐々に減少する傾向がみられた。食事との関係を見ると、リ

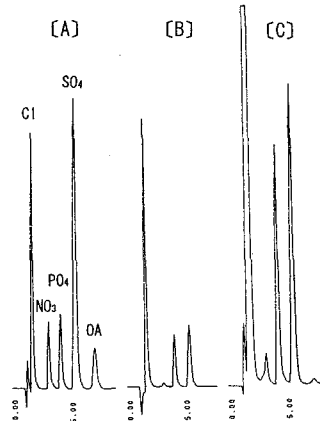


Fig. 1 Chromatograms of standard [A], urine ($\times 1/1000$) [B], urine ($\times 1/100$) [C]

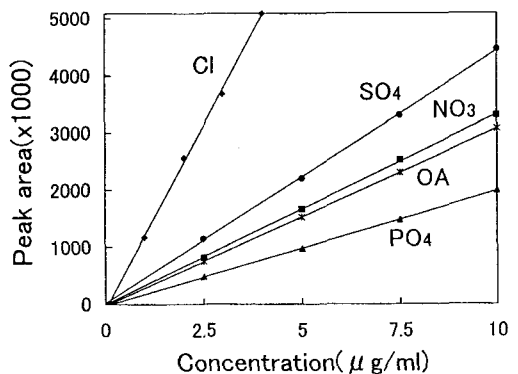


Fig. 2 Calibration curves for anions.

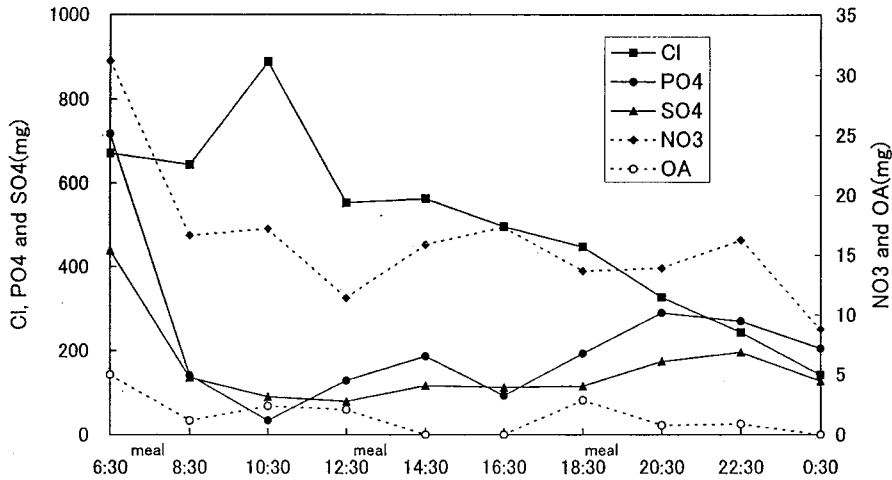


Fig. 3 Time course of urinary excretion of anions.

ン酸イオン，硫酸イオン及び硝酸イオンが食事後ほぼ3～4時間で排泄量が増える傾向がみられた。なお各物質の1日総排泄量は，塩化物イオンが4976.2mg，硝酸イオンが162.2mg，リン酸イオンが2259.8mg，硫酸イオンが1584.7mg，シュウ酸が15.2mgであった。またこの各測定時間における排泄量の相関関係を，成分間で比較するとFig. 4のようにリン酸イオンと硫酸イオンの間にスピアマン順位相関係数が $r = 0.8667$ ($p < 0.01$)

で有意な正の相関関係がみられた。これ以外の成分間の相関は認められなかった。

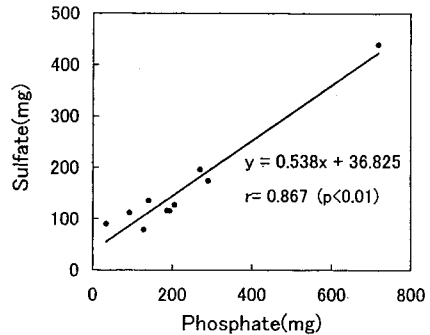


Fig. 4 Correlation between the amounts of urinary phosphate and sulfate for each time.

考 察

尿中に排泄される物質の測定方法として，高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が簡便で精度が高い方法として広く利用されているが，今回HPLCの一種であるイオンクロマトグラフィーによる陰イオン物質及びシュウ酸の定量性を検討した結果，塩化物イオン，硝酸イオン，リン酸イオン，硫酸イオン及びシュウ酸について，前処理が不要で感度的にも十分に利用できる方法である事が確認された。

本方法により定量可能な物質について，その測定の意義を文献的に述べると，塩化物イオンについては，尿中排泄される塩化物イオンはナトリウムとほぼ同じ当量であるといわれているので，塩

化物イオンを測定すればナトリウムあるいは食塩摂取量の推定が可能である⁶⁾。

リン酸については、その排泄量からリン(P)の排泄量が計算できる。リンはカルシウムとともに体組成、特に細胞内の主要な物質であり、摂取量のモニタリングは必要である。リンの尿中排泄⁷⁾については、上皮小体ホルモン、ビタミンD、腎機能などの多因子の関与が認められているが、一般的にリン摂取量が4~30mg/kg/日のとき、腸管からの正味リン吸収率は摂取量の60~65%であるといわれ、たとえ腎不全の状態であっても尿中リン排泄は摂取量の約60%とほぼ一定に保持されていることが認められている。

硝酸については、窒素酸化物である亜硝酸塩は発ガン性物質であるニトロソアミンの前駆体になりうる物質として知られている⁸⁾。また、硝酸塩も唾液中の細菌により亜硝酸塩に還元されるため亜硝酸塩の供給源として注目されている⁹⁾。それゆえ硝酸塩の含量の多い食事をした場合の唾液中における硝酸塩、亜硝酸塩の経時変化⁹⁾および硝酸塩の尿中への排泄が追及されている¹⁰⁾。そして摂取した硝酸塩の尿中への排泄率は50%程度であるという報告もある¹¹⁾。

硫酸については、硫酸塩とタウリンが哺乳動物におけるシステイン代謝の重要な最終産物^{12, 13)}であり、硫酸塩は哺乳動物において様々な重要な役割を果たしている。Medesの報告¹⁴⁾によれば、摂取されたL-システイン及びL-メチオニンからの硫黄は、ヒトの場合ほとんど100%が尿中に硫酸塩として排泄された。ネズミでは、腹腔内注入されたL-システインの硫黄の95%は、フリーの硫酸塩とタウリンとして排泄された¹⁵⁾。また Yukihiro ら¹⁶⁾は、高タンパク質食品の毎日の摂取がより多くの硫酸塩排泄となるということ、さらにタウリンと硫酸塩生産の比率が食事のタンパク質内容によって決定されたということ、そして、食事のタンパク質の摂取量が増加するとき、硫酸塩生産の増加がタウリン生産より大きいということを示唆した。

シュウ酸については、尿路結石は頻度の高い疾患で、中でもシュウ酸カルシウムは混合結石も含めると全結石の約70%を占める¹⁷⁾。以前より、シュウ酸カルシウム結石発生に関する因子の中で尿中カルシウム濃度とシュウ酸濃度が重要視されてきた。特に尿中シュウ酸濃度はシュウ酸カルシウムの過飽和に対しカルシウム濃度よりもはるかに強い影響を与えるといわれている¹⁸⁾。このことから、尿中シュウ酸濃度測定は尿路結石症の病態解明や治療、予後のモニタリングへの第1関門に位置する重要な課題となる。尿中に排泄されるシュウ酸は、食物から吸収される外因性のものと体内で生成される内因性のものに大別される。平常成人がバランスの取れた食事を摂っていれば、尿中シュウ酸の約15%が食事から吸収されたシュウ酸に由来し、内因性のものとして、35~44%がアスコルビン酸から、40%がグリシンから、10%がグリコレートなどから体内で作られる¹⁹⁾。しかし、低カルシウム食の場合、食事性シュウ酸の占める割合は最高50%にも達する¹⁹⁾という。したがって、尿中シュウ酸に由来する尿路結石症の予防には、食事のシュウ酸量をできるだけ減らすこと、また、シュウ酸を摂取した場合にはカルシウムを十分に摂取して消化器内でシュウ酸カルシウムを形成させ、胃及び腸からのシュウ酸の吸収を低下させることが肝要である¹⁹⁾。カルシウム不足の状態では、シュウ酸の摂取量の多い食生活は尿路結石症の発病に結びつく可能性がある。

要 約

尿中に排泄される5種類の陰イオン物質について、それらの摂取量のモニタリングの目的でイオンクロマトグラフィーによる定量法を検討し、次のような結果を得た。

1. イオンクロマトグラフィーにより簡便に尿中の5種の陰イオン物質の測定が可能となった。
2. 検出限界は、塩素イオンが $0.202 \mu\text{g/ml}$ 、硝酸イオンが $0.256 \mu\text{g/ml}$ 、リン酸イオンが $0.087 \mu\text{g/ml}$ 、硫酸イオンが $0.237 \mu\text{g/ml}$ 、シュウ酸が $0.025 \mu\text{g/ml}$ であった。
3. 尿中排泄量の時間経過をみると、硝酸イオン、リン酸イオン及び硫酸イオンが食事との関係がみられ、食事後3～4時間で増加していた。
4. 各測定時間での排泄量を比較すると、リン酸イオンと硫酸イオンの間に相関関係が認められた ($r=0.8667$, $p<0.01$)。

参 考 文 献

- 1) Ogata, M., Kira, S., Shimada, Y., Ohsaki, H., Sugihara, R. and Fujii, T. : Comparison of several methods for the measurement of urinary hippuric acid as an index of toluene exposure. *Acta Medica Okayama*, 34, 361–366, 1980
- 2) Ogata, M. and Shimada, Y. : Differences in urinary monochlorobenzene metabolites between rats and humans. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 53, 51–57, 1983
- 3) Shimada, Y. and Ko, S. : Simultaneous determination of urinary ascorbic acid and creatinine by high performance liquid chromatography. *J. Chugoku Junior College*, 27, 89–95, 1996
- 4) 嶋田義弘：高速液体クロマトグラフィーによる尿中リボフラビンの測定. *中国短期大学紀要*, 31, 107–111, 2000
- 5) 高 早苗, 嶋田義弘, 吉田企世子：タアツァイの含有成分について—アスコルビン酸, β -カロチン, シュウ酸, 硝酸および無機塩類含有量—. *中国短期大学紀要*, 24, 51–56, 1993
- 6) 川崎晃一：高血圧の減塩療法. *臨床栄養*, 77, 726–734, 1990
- 7) 平田清文, 菊池宏章, 小沢尚, 花岡瞳, 近藤修康, 森本修三：日本人のCa, P摂取と尿中排泄. *日本臨床*, 40, 2565–2570, 1982
- 8) 小田嶋成和：N-ニトロソ化合物による発ガン研究の進歩. *食衛誌*, 15, 419–433, 1974
- 9) Harada, M., Ishiwata, H., Nakamura, Y., Tanimura, A. and Ishidate, M. : Studies on in vivo formation of nitroso compounds(I). *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 16, 11–18, 1975
- 10) Ishiwata, H., Mizushiro, H., Tanimura, A. and Murata, T. : Metabolic fate of the precursors of N-nitroso compounds(III) Urinary excretion of nitrate in man. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 19, 318–322, 1978

- 11) 丸山節子, 清水重徳, 村松紘一: 長野県下住民の食事からの硝酸塩摂取量と排せつ量. 食衛誌, 20, 276-282, 1979
- 12) Roy, AB. and Trudinger, PA.: The biochemistry of inorganic compounds of sulphur. Cambridge University Press, Cambridge pp289-316, 1970.
- 13) Griffith, OW.: Mammalian sulfur amino acid metabolism: An overview; in Methods in Enzymology, Jakoby WB and Griffith OW eds, Vol 143, Academic Press, New York pp366-376, 1987
- 14) Medes, G.: CLXVIII. Metabolism of sulphur. IV. Oxidation in the body of the sulphur containing amino-acids and some of their partially oxidized derivatives. Biochem. J. 31, 1330-1346, 1937
- 15) Yoshida, S., Akagi, R. and Ubuka, T.: Sulfate and taurine excretion in rats after L-cysteine administration. Acta Medica Okayama, 43, 281-288, 1989
- 16) Yukihiro, K., Tomozawa, M., Abe, T., Yao, WB., Ohta, J. and Ubuka, T.: Excretion of sulfate and taurine in rats fed with a high protein diet. Acta Medica Okayama, 52, 71-75, 1998
- 17) 伊藤晴夫: 腎尿路結石発生機序および分析法. 腎と透析, 31, 23-27, 1991
- 18) Ito, H., Suzuki, F., Yamaguchi, K., Nishiyama, Y. and Kotake, T.: Reduction of urinary oxalate by combined calcium and citrate administration without increase in urinary calcium oxalate stone formers. Clin. Nephrol., 37, 14-18, 1992
- 19) Hodgkison, A.: Evidence of increased oxalate absorption in patients with calcium-containing renal stones. Clin. Sci. Mol. Med., 54, 291-294, 1978