

平成 15 年度厚生労働科学研究費（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）
日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究
主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

・水溶性ビタミン関連化合物の定量方法

10．トリプトファン-キノリン酸関連代謝産物

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

本研究で使用したトリプトファン-キノリン酸関連代謝産物の測定方法についてまとめた。

A．実験方法

1. HPLC を用いた尿中アンスラニル酸
(Anthranilic acid: AnA) 測定法

1-1.試薬作成方法

AnA 標準（凍結保存）

Anthranilic acid=137.14（和光純薬工業株式会社，室内保存）

1) 1 mg / ml の AnA を作成（in メタノール）
AnA を 0.0019 g 秤量し，メタノールを 1.9 ml 加えた。

2) 50 倍希釈する．1) を 0.1 ml 取り，メタノールを 4.9 ml 加えた。

3) 2) の吸光度を測定し（対照セルにはメタノールをいれる）， $\epsilon_{333\text{nm}} = 3990$ より正確な値を求めた． $(0.2742 / 3990 = 6.87 \times 10^{-5} \text{M})$

4) さらに 50 倍希釈する 2) を 0.02 ml 取り，メタノールを 0.98 ml 加えて，さらに 50 倍希釈し，この液を標準として $(1.37 \times 10^{-6} \text{M})$ ，20 μl インジェクトした．標準のスペクトルを図 1 に示した。

1M KH₂PO₄ (pH 3.0)

リン酸二水素カリウム=136.09 g

リン酸二水素カリウム 136.09 g を秤量し，水を 800 ml 程度加え，完全に溶解させる．pH メーターを利用して，リン酸を滴下して，pH を 3.0 に調整した．その後，水で 1000 ml にした。

1-2.試料作成方法

尿

- ↓ 遠心分離 2000rpm，5 min
- ↓ （卓上多本架遠心機 LC-122）
- ↓ 0.45 μm のフィルターでろ過

HPLC 注入用試料

1-3.測定条件

移動相：1M KH₂PO₄ (pH 3.0) 50 ml
超純水 600 ml
アセトニトリル 350 ml

流速：1.0 ml / min

PRESSURE：140 kgf / cm² 程度

カラム：TOSOH TSK-GEL ODS- 80 Ts
($\phi 4.6 \times 250 \text{ mm}$)

カラム温度：40

検出器：SHIMADZU RF-10AXL

データプロセッサー：SHIMADZU CR-8A

検出方法：蛍光法（励起波長 340 nm、蛍光波長 410 nm）

1-4.計算方法

1) AnA 標準 $(1.37 \times 10^{-6} \text{M})$ を 20 μl インジェクトした $(27.4 \text{ pmol}$ インジェクトした)．1 pmol あたりの面積を計算する．(図 2)
例) $1048111 / 27.4 = 38252 / \text{pmol}$

2) AREA / 1 pmol あたりの面積 $\times$ 一日の尿量
 $(\text{ml}) / 0.02 \text{ ml} \times 10^{-3} = \text{nmol} / \text{day}$
0.02 ml = 試料注入量

例) ラット尿 (図 3)

$965815 / 38252 \times 25 / 0.02 \times 10^{-3} = 32 \text{ nmol/day}$

2. HPLC を用いた尿中キノレン酸 (Kynurenic acid: KA) 測定法

2-1.試薬作成方法

KA 標準（凍結保存）

Kynurenic acid= 207.19（和光純薬株式会社，室内保存）

1) 0.1 mg / ml の KA を作成．(in 0.6 M PCA)
KA を 0.0004 g 秤量し，0.6 M PCA を 4 ml 加えてスターラーで溶解させた。

2) 20 倍希釈する．1) を 0.2 ml 取り，0.6 M PCA を 3.8 ml 加えた。

- 3) 2) の吸光度を測定し (対照セルには 0.6 M PCA をいれる), $\epsilon_{243\text{nm}} = 42500$ より正確な濃度を求め, この液を標準として 20 μl インジェクトした. ($0.3889 / 42500 = 9.15 \times 10^{-6}$ M) 標準のスペクトルを図 4 に示した.

0.6 M PCA (室内保存)

Perchlonic acid = 100.46 (和光純薬株式会社, 室内保存)

70% PCA (11.65 M) 1.0 ml に超純水を 18.4 ml 加えた.

0.5 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5)

Sodium Acetate Trihydrate = 136.08 (和光純薬株式会社, 室内保存)

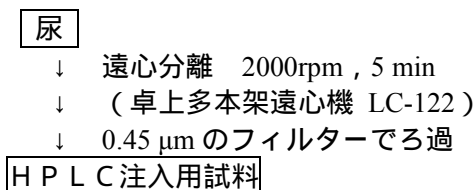
- 1) ビーカーに酢酸ナトリウム三水和物を 68.04 g 秤量して約 800 ml の超純水を入れ, スターラーで溶解後, 1 L にメスアップした. (0.5 M 酢酸ナトリウム)
- 2) 酢酸 (17.4 M) 1 ml に超純水を 33.8 ml 加えた. (0.5 M 酢酸)
- 3) 1) を 2) で pH 4.5 に合わせた.

1 M 酢酸亜鉛 (室内保存)

Zinc Acetate Dihydrate = 219.51 (和光純薬株式会社, 室内保存)

ビーカーに酢酸亜鉛を 219.51 g 秤量して約 800 ml の超純水を入れ, スターラーで溶解後, 1 L にメスアップした.

2-2. 試料作成方法



2-3. 測定条件

移動相: 0.5 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) 20 ml

超純水 980 ml

アセトニトリル 52.6 ml

流速: 1.0 ml / min

PRESSURE: 112 kgf / cm^2 程度

カラム: TOSOH ODS-80Ts ($\phi 4.6 \times 250$ mm)

カラム温度: 40

検出器: HITACHI F - 1050

データプロセッサー: HITACHI D-2500

検出方法: 蛍光法 (励起波長 344 nm、蛍光波長 398 nm)

* ポストカラム液: 1 M 酢酸亜鉛 (1 ml / min)

図 5 にキヌレン酸測定用の HPLC のシステムの概略を示した.

2-4. 計算方法

- 1) KA 標準 (9.15×10^{-6} M) を 20 μl インジェクトした (183 pmol インジェクトした). 1 pmol あたりの面積を計算する. (図 6)
例) $1537325 / 183 = 8401$ / pmol

- 2) $\text{AREA} / 1 \text{ pmol あたりの面積} \times \text{一日の尿量 (ml)} / 0.02 \text{ ml} \times 10^{-3} = \text{nmol / day}$
0.02 ml = 試料注入量

例) ラット尿 (図 7)

$$2439925 / 8401 \times 25 / 0.02 \times 10^{-3} = 363 \text{ nmol / day}$$

3. HPLC を用いた尿中 3-ヒドロキシアンスラニル酸 (3-Hydroxyanthranilic acid: 3-HA), 尿中キサンツレン酸 (Xanthurenic acid: XA) 測定法

3-1. 試薬作成方法

3-HA 標準 (凍結保存)

3-Hydroxy anthranilic acid = 153.14 (東京化成工業株式会社, 室内保存)

- 1) 0.1 mg / ml の 3-HA を作成 (in メタノール). 3-HA を 0.0014 g 秤量し, メタノールを 14.0 ml 加えてスターラーで溶解させた.
- 2) 5 倍希釈する. 1) を 1.0 ml 取り, メタノールを 4.0 ml 加えた.
- 3) 2) の吸光度を測定し (対照セルにはメタノールをいれる), $\epsilon_{340\text{nm}} = 3860$ より正確な濃度を求めた ($0.5774 / 3860 = 1.50 \times 10^{-4}$ M)
- 4) さらに 100 倍希釈する. 3) を 0.01 ml 取り, メタノールを 0.99 ml 加えて 100 倍希釈し, この液を標準として (1.50×10^{-6} M), 20 μl インジェクトした.
標準のスペクトルを図 8 に示した.

XA 標準 (凍結保存)

Xanthurenic acid = 205.17 (和光純薬株式会社, 室内保存)

- 1) 0.1 mg / ml の XA を作成 (in 移動相). XA を 0.0008 g 秤量し, 移動相を 8.0 ml 加えてスターラーで溶解させた.
- 2) 1) の吸光度を測定し (対照セルには移動相をいれる), $\epsilon_{340\text{nm}} = 8648$ より正確な濃度を求め, この液を標準として, 20 μl インジェクションした. ($0.5645 / 8648 = 6.53 \times 10^{-5}$ M)
標準のスペクトルを図 9 に示した.

1 M KH_2PO_4 (pH 3.0)

リン酸二水素カリウム=136.09

リン酸二水素カリウム 136.09 g を秤量し、水を 800 ml 程度加え、完全に溶解させる。pH メーターを利用して、リン酸を滴下して、pH を 3.0 に調整した。その後、水で 1000 ml にした。

3 mg / ml EDTA-2Na (冷蔵保存)

EDTA-2Na= 372.24 (和光純薬株式会社、室内保存)

EDTA-2Na を 0.0162 g 秤量し、超純水を 5.4 ml 加えた。

3-2. 試料作成方法

尿

- ↓ 遠心分離 2000rpm, 5 min
- ↓ (卓上多本架遠心機 LC-122)
- ↓ 0.45 μ m のフィルターでろ過

HPLC 注入用試料

3-3. 測定条件

移動相: 1 M KH_2PO_4 (pH 3.0)	50 ml
超純水	949 ml
3 mg / ml EDTA-2Na	1 ml
アセトニトリル	100 ml

流速: 1.0 ml / min

PRESSURE: 85 kgf / cm^2

カラム: STR ODS- (φ4.6×250mm)

カラム温度: 40

検出器:

3-HA——SHISEIDO NANOSPACE SI-2

XA——SHIMADZU SPD-10AVVP

データプロセッサー:

3-HA——SHIMADZU CR-8A

XA——SHIMADZU CR-6A

検出方法:

3-HA——電気化学検出器 印加電圧 +500 mV

XA——紫外分光光度計 UV 法 (340 nm)

3-HA と XA の同時定量方法の HPLC のシステムを図 10 に示した。

3-4. 計算方法

3-HA:

1) 3-HA 標準 (1.50×10^{-6} M) を 20 μ l インジェクトした (30 pmol インジェクトした)。1 pmol あたりの面積を計算する。(図 11)

例) $589861 / 30 = 19662 / \text{pmol}$

2) $\text{AREA} / 1 \text{ pmol あたりの面積} \times \text{一日の尿量 (ml)} / 0.02 \text{ ml} \times 10^{-3} = \text{nmol / day}$
0.02 ml = 試料注入量

例) ラット尿 (図 12)

$1489526 / 19662 \times 25 / 0.02 \times 10^{-3} = 95 \text{ nmol / day}$

XA:

1) XA 標準 (6.53×10^{-5} M) を 20 μ l インジェクトした (1.31 nmol インジェクトした)。1 nmol あたりの面積を計算する。(図 13)

例) $325136 / 1.31 = 248195 / \text{nmol}$

2) $\text{AREA} / 1 \text{ nmol あたりの面積} \times \text{一日の尿量 (ml)} / 0.02 \text{ ml} = \text{nmol / day}$
0.02 ml = 試料注入量

例) ラット尿 (図 14)

$45165 / 248195 \times 25 / 0.02 = 227 \text{ nmol / day}$

4. HPLC を用いた尿中キノリン酸 (Quinolinic acid: QA) 測定法

4-1. 試薬作成方法

QA 標準 (凍結保存)

Quinolinic acid = 167.13 (半井化学薬品株式会社、室内保存)

1) 0.1 mg / ml の QA を作成。QA を 0.0019 g 秤量し、超純水を 19.0 ml 加え、溶解させた。

2) 5 倍希釈する。1) を 1.0 ml 取り、超純水を 4.0 ml 加えた。

3) 2) の吸光度を測定し、 $\epsilon_{275\text{nm}} = 4040$ より正確な濃度を求め、この液を標準として、20 μ l インジェクトした。 $(0.4173 / 4040 = 1.03 \times 10^{-4} \text{ M})$

標準のスペクトルを図 15 に示した。

0.2 M クエン酸溶液

クエン酸一水和物 = 210.14

クエン酸一水和物 2.10 g を秤量し、水にて 50 ml にした。

1 M KH_2PO_4 (pH was adjusted 3.8 by 0.2 M citric acid)

リン酸二水素カリウム = 136.09

リン酸二水素カリウム 68.045 g を秤量し、水を 400 ml 程度加え完全に溶解させた。pH メーターを使用して、0.2 M クエン酸をこれに滴下し、pH 3.8 に調整後、水で 500 ml にした。

4-2. 試料作成方法

尿

- ↓ 遠心分離 2000rpm, 5 min
- ↓ (卓上多本架遠心機 LC-122)
- ↓ 0.45 μ m のフィルターでろ過

HPLC 注入用試料

4-3.測定条件

移動相：1 M KH_2PO_4 (pH was adjusted to 3.8 by
0.2 M citric acid) 50 ml
過酸化水素 40 ml
15% TMA (Tetramethylammonium
hydroxide solution) 30 μl
超純水で 1 L にする .

流速：0.6ml / min

PRESSURE：56kgf / cm^2 程度

カラム：Unisil Q C 81 ($\phi 4.6 \times 250$ mm)

カラム温度：30

検出器：SHIMADZU RF – 10AXF

データプロセッサー：SHIMADZU CR – 6A

検出方法：蛍光法 (励起波長 326 nm、蛍光波
長 380 nm)

4-4.計算方法

1) QA 標準 (1.03×10^{-4} M) を 20 μl インジェ
クトした (2.06 nmol インジェクトした).
1 nmol あたりの面積を計算する . (図 16)

例) $1205640 / 2.06 = 585262$ / pmol

2) AREA / 1 nmol あたりの面積 $\times$ 一日の尿量
(ml) / 0.02 ml = _____ nmol / day
0.02 ml = 試料注入量

例) ラット尿 (図 17)

$191815 / 585262 \times 25 / 0.02 = 410$ nmol / day

B . 健康危険情報

特記する情報はない .

C . 研究発表

1 . 論文発表

なし

2 . 口頭発表

なし

D . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含 む)

1 . 特許予定

なし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし

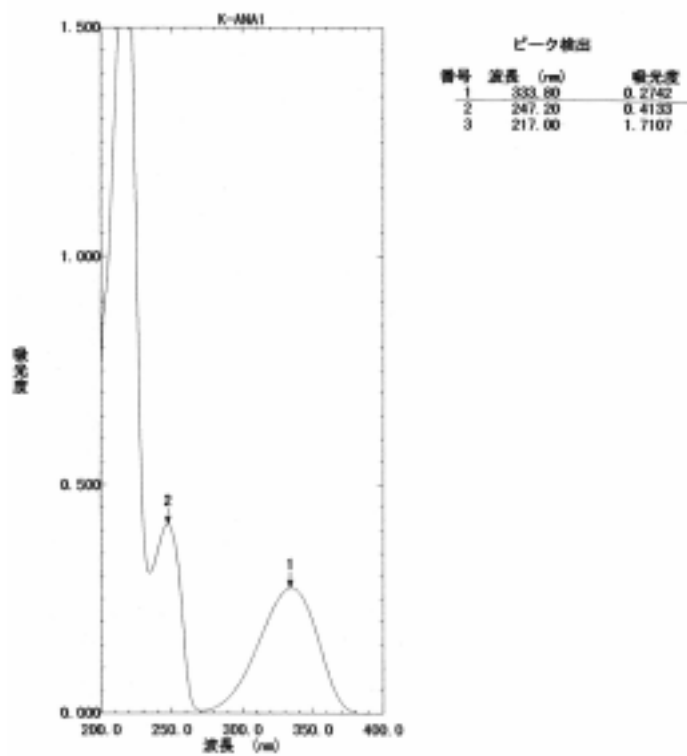


図1．アンスラニル酸の UV スペクトラム

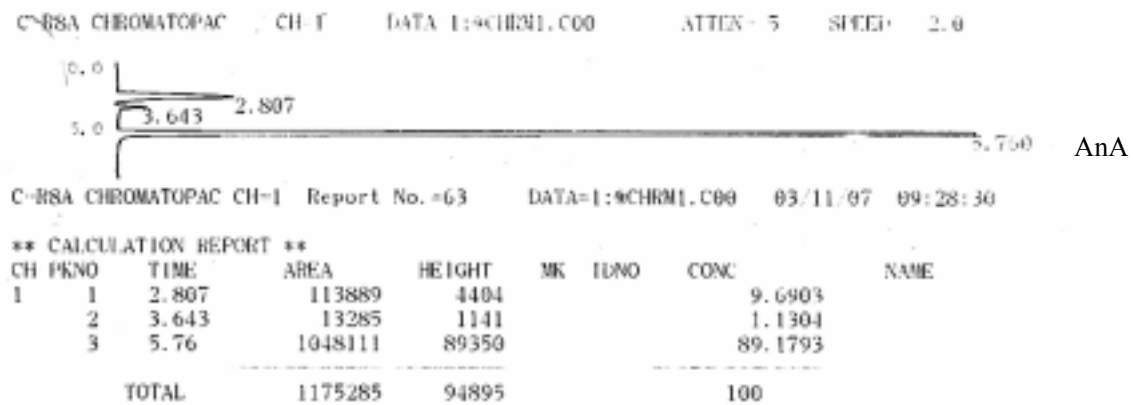


図2．標準のアンスラニル酸の HPLC クロマトグラム の例

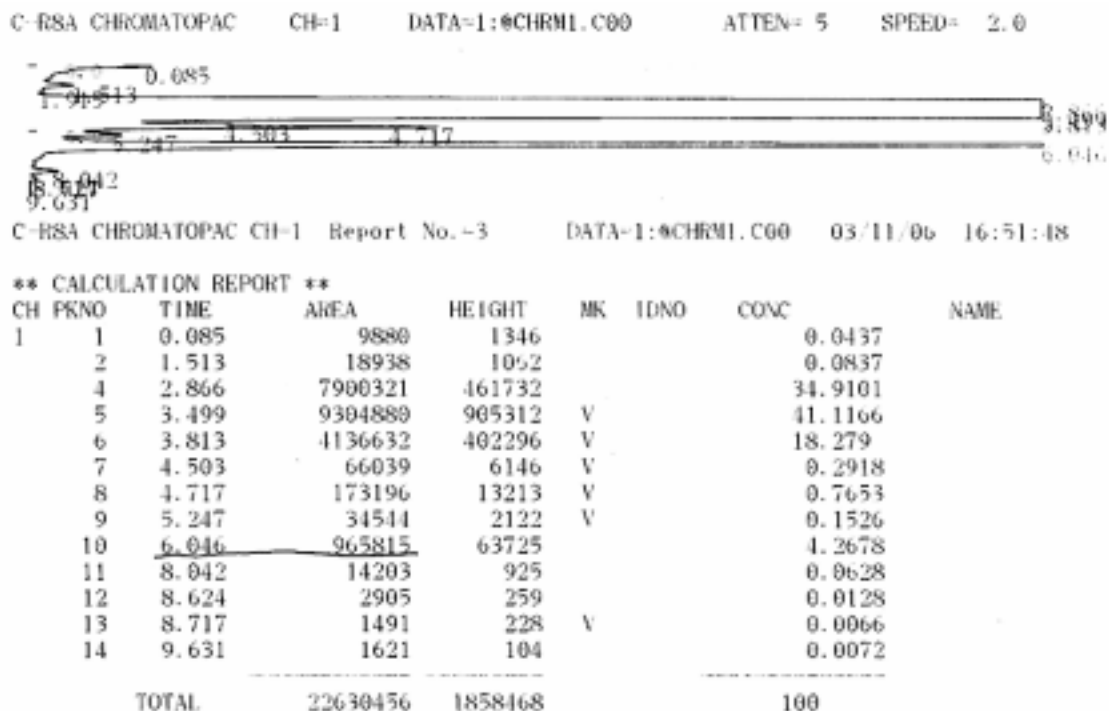


図3．尿を試料としたときのアンスラニル酸の HPLC クロマトグラムの例

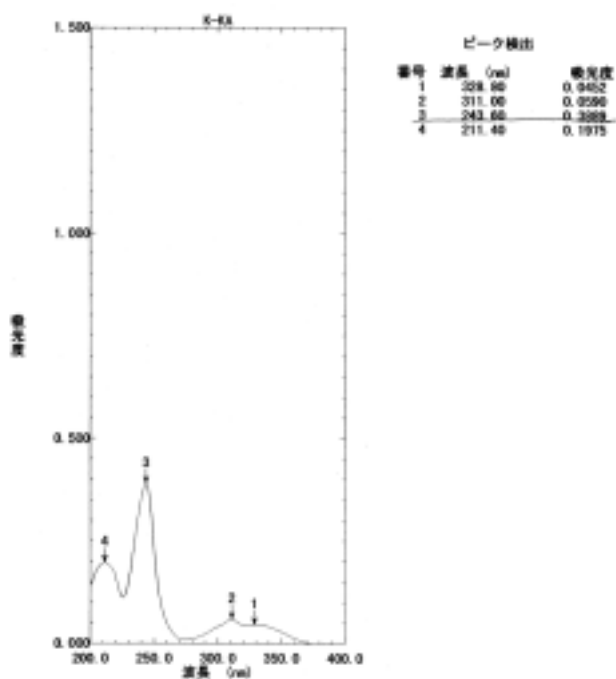


図4．キヌレン酸の UV スペクトラム

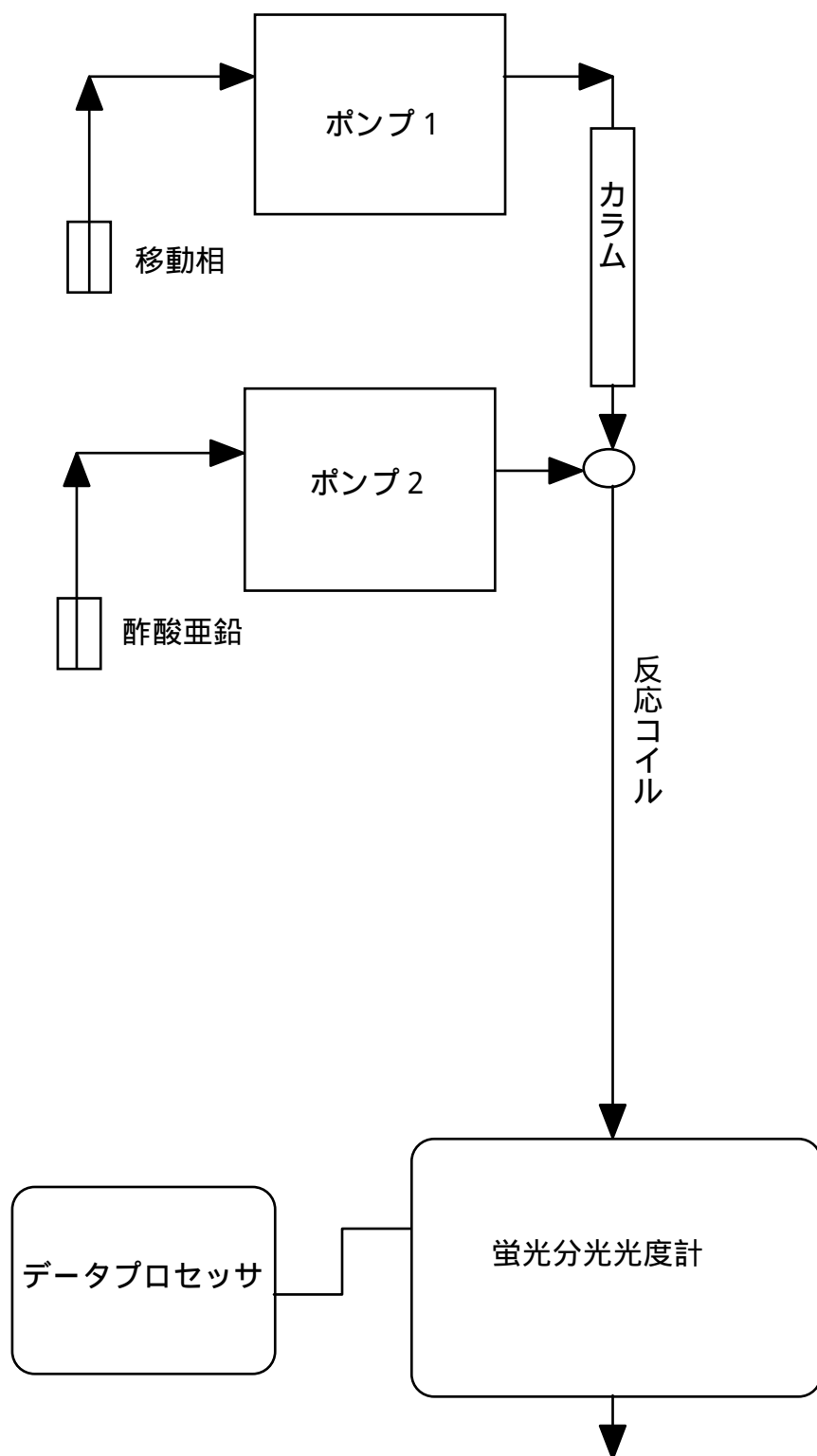


図 5 . キヌレン酸測定用 HPLC システムの概略図

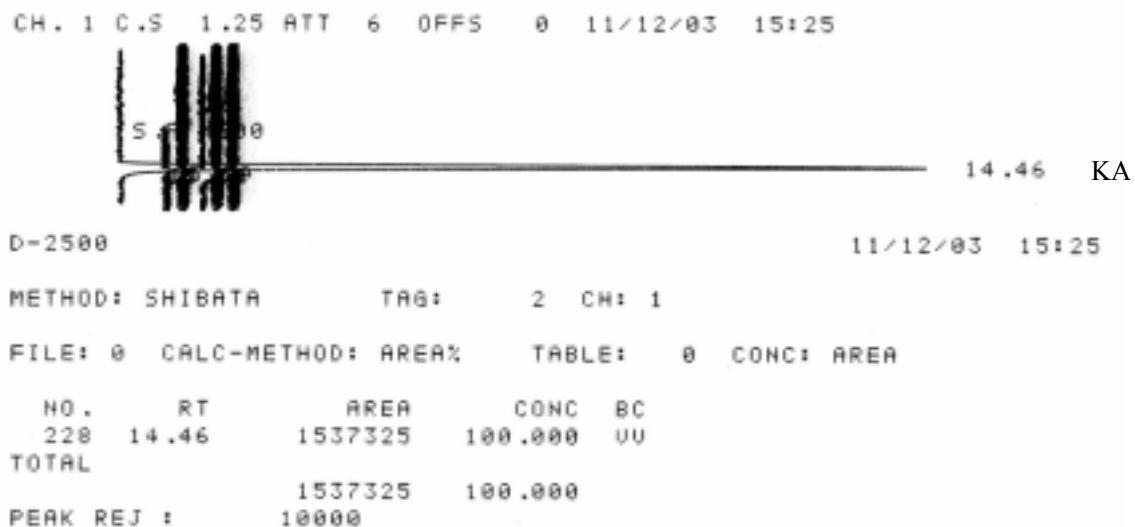


図6．標準のキヌレン酸の HPLC クロマトグラム の例

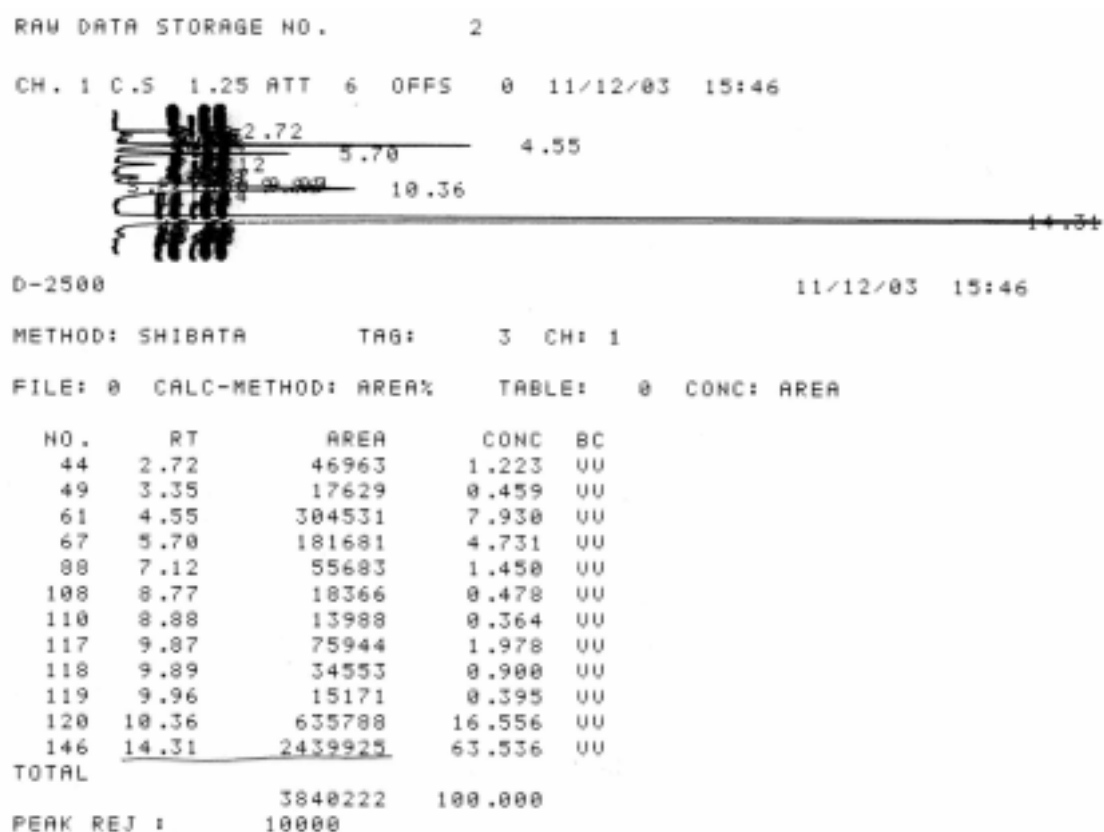


図7．尿を試料としたときのキヌレン酸の HPLC クロマトグラム の例

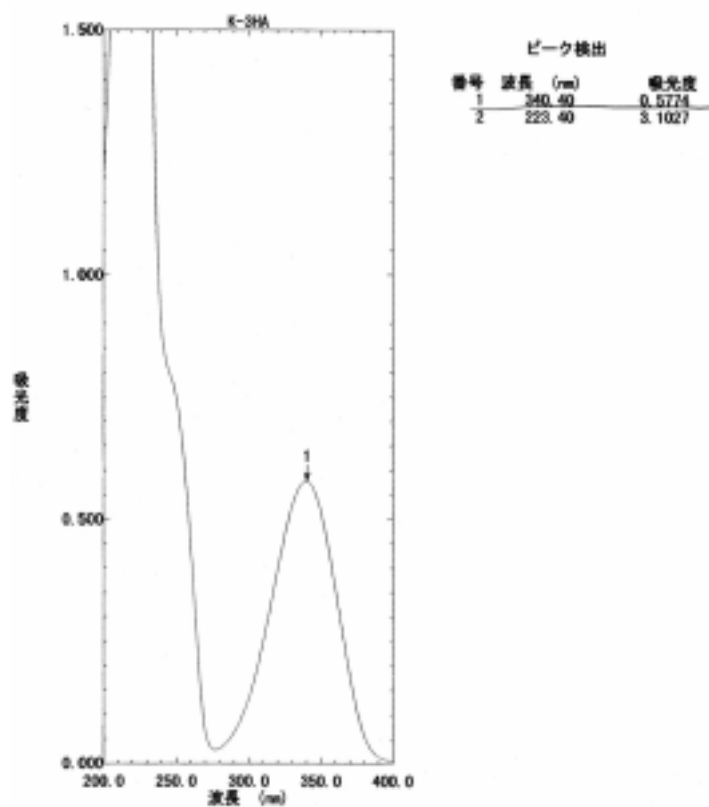


図 8 . 3-ヒドロキシアンスラニル酸の UV スペクトラム

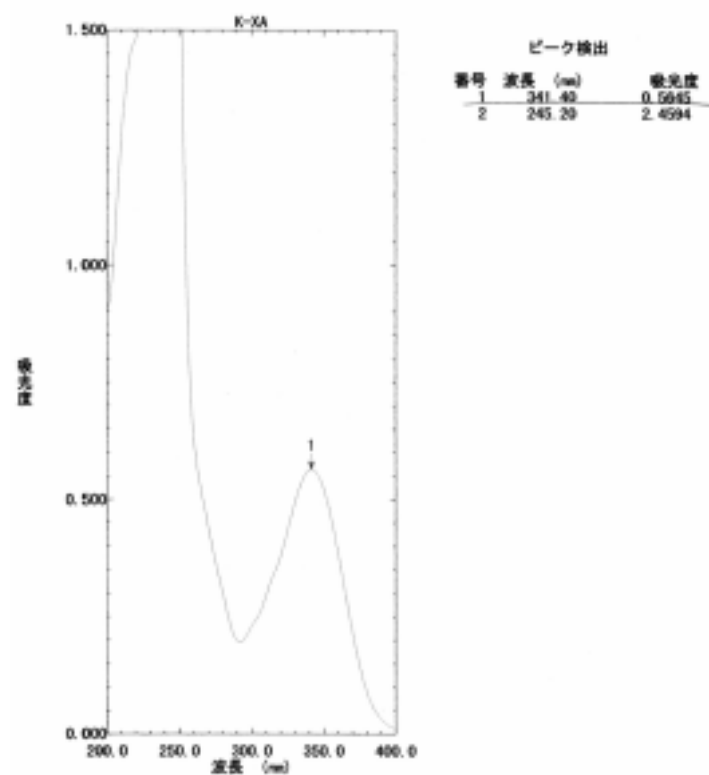


図 9 . キサンツレン酸の UV スペクトラム

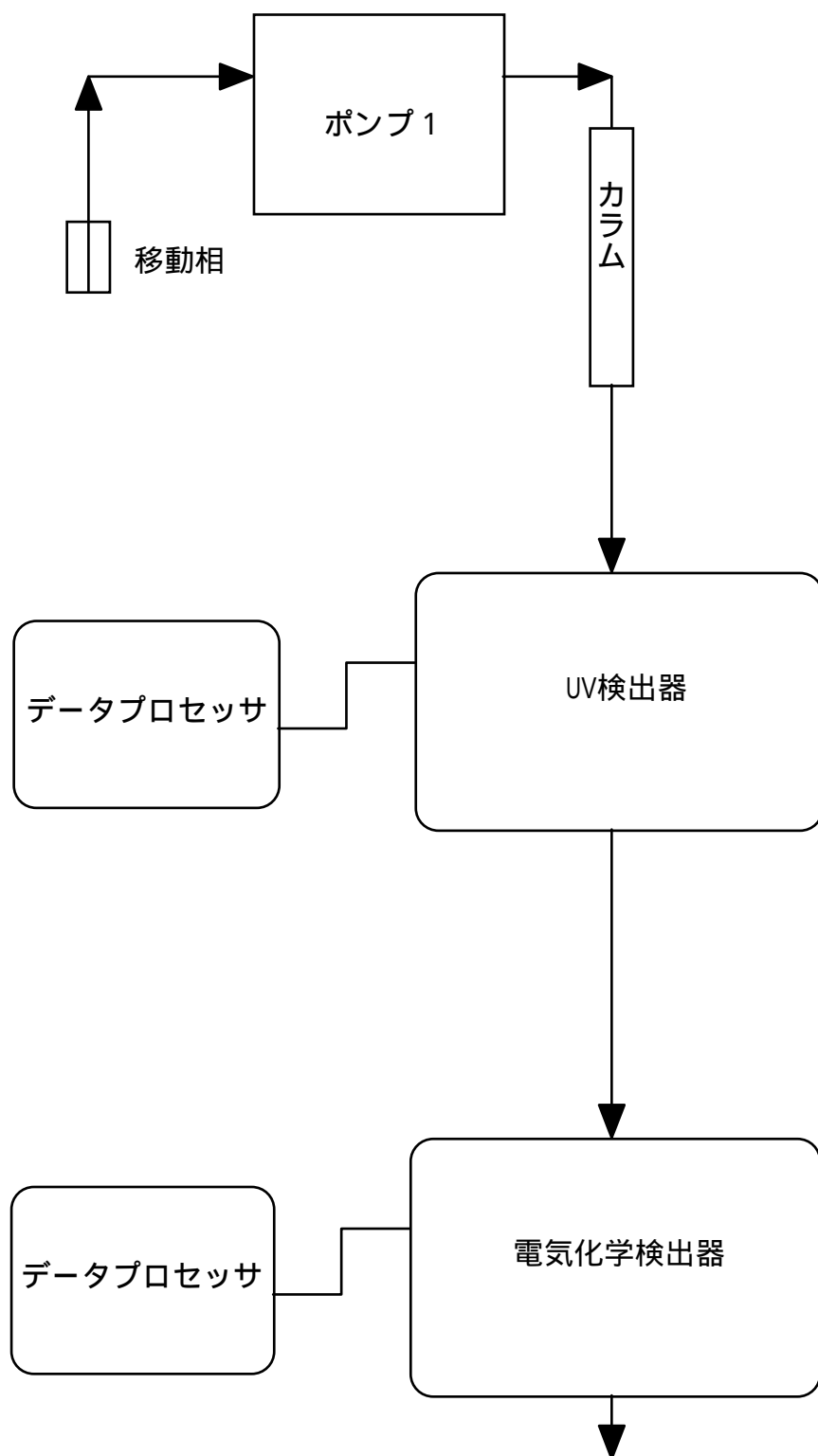


図 10 . 3-HA と XA の同時定量用 HPLC のシステムの概略図

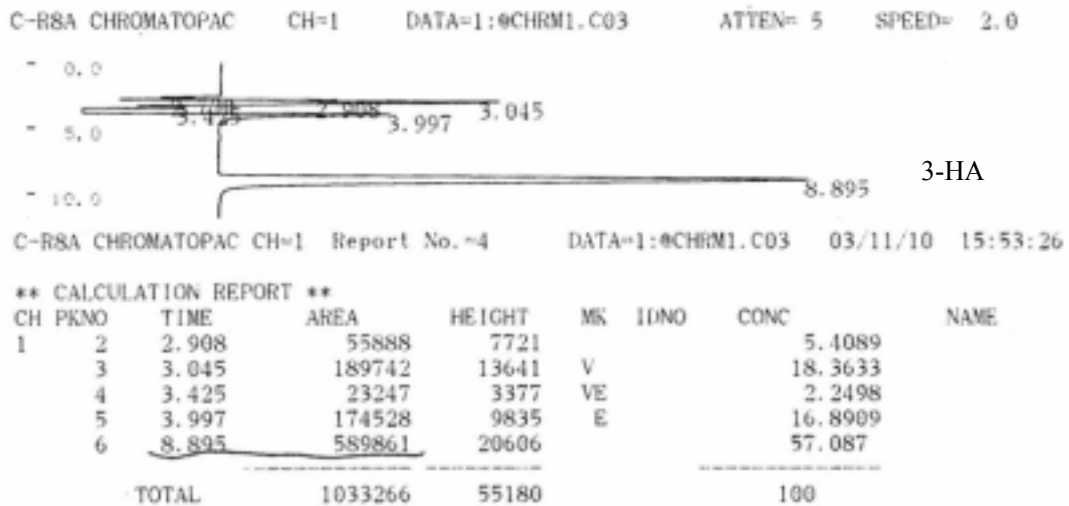


図 11 . 標準の 3-ヒドロキシアンスラニル酸の HPLC クロマトグラム の例

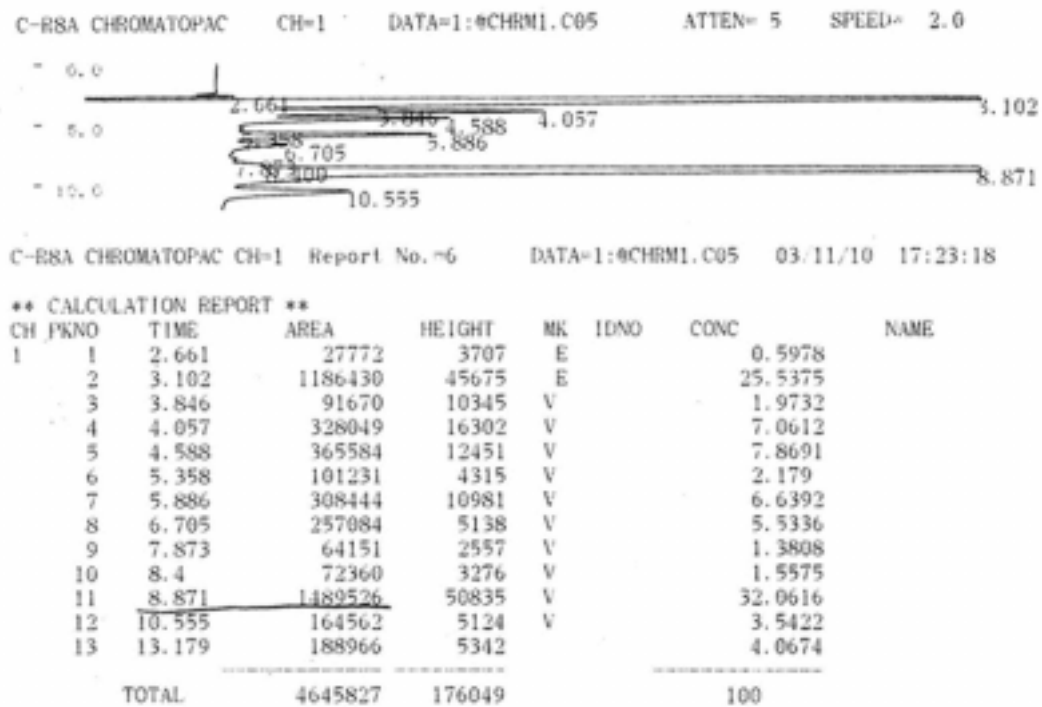


図 12 . 尿を試料としたときの 3-ヒドロキシアンスラニル酸の HPLC クロマトグラム の例

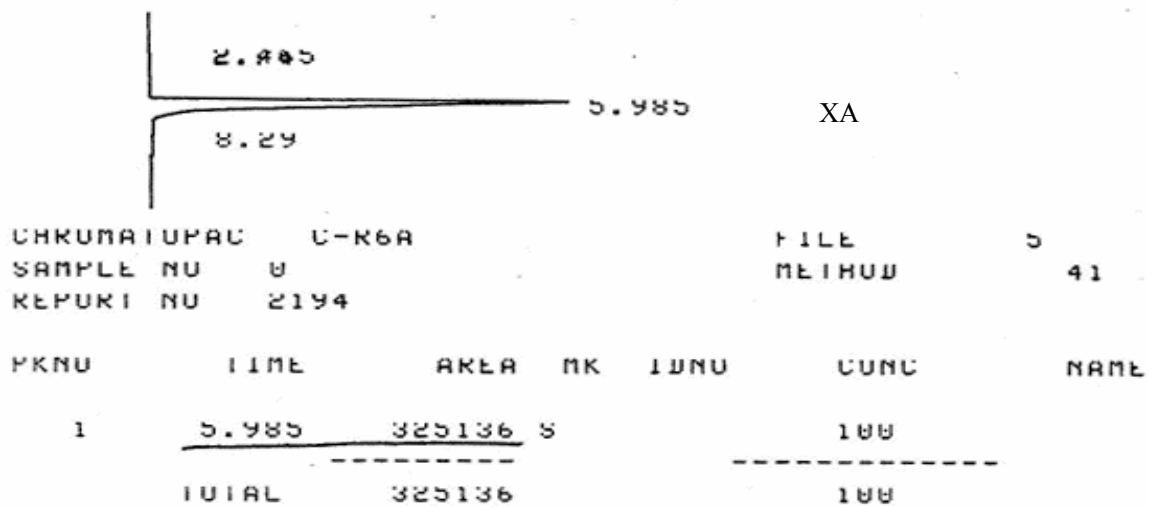


図 13 . 標準のキサンツレン酸の HPLC クロマトグラム の例

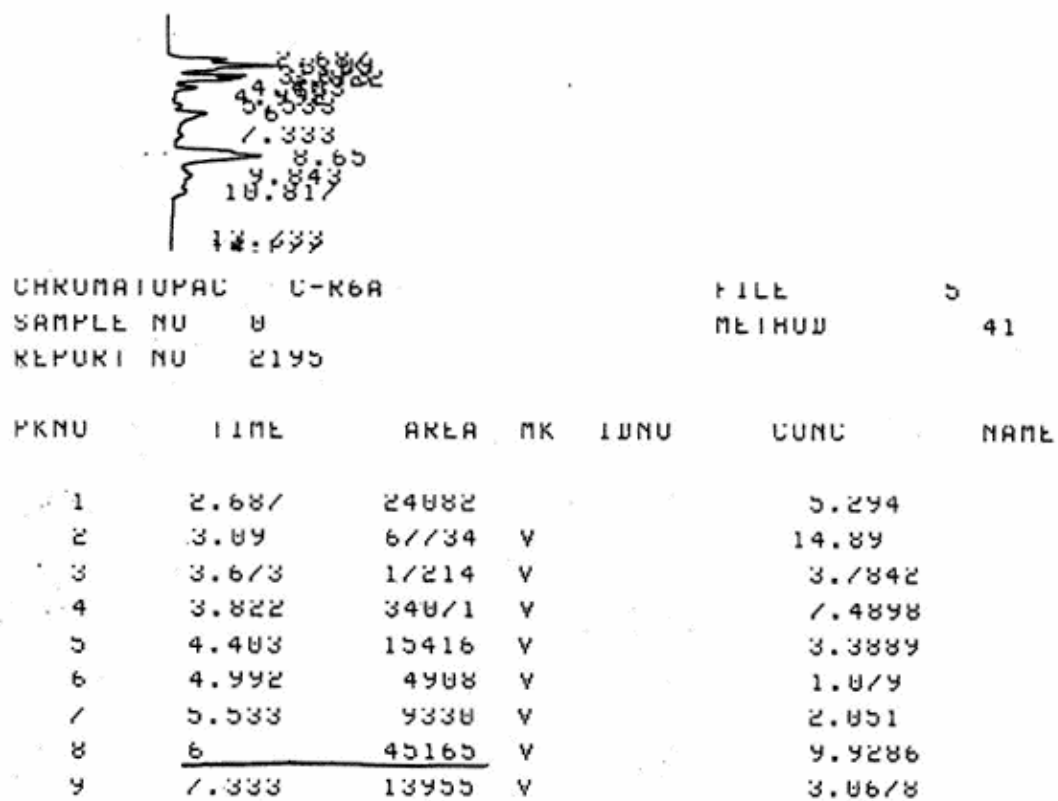


図 14 . 尿を試料としたときのキサンツレン酸の HPLC クロマトグラム の例

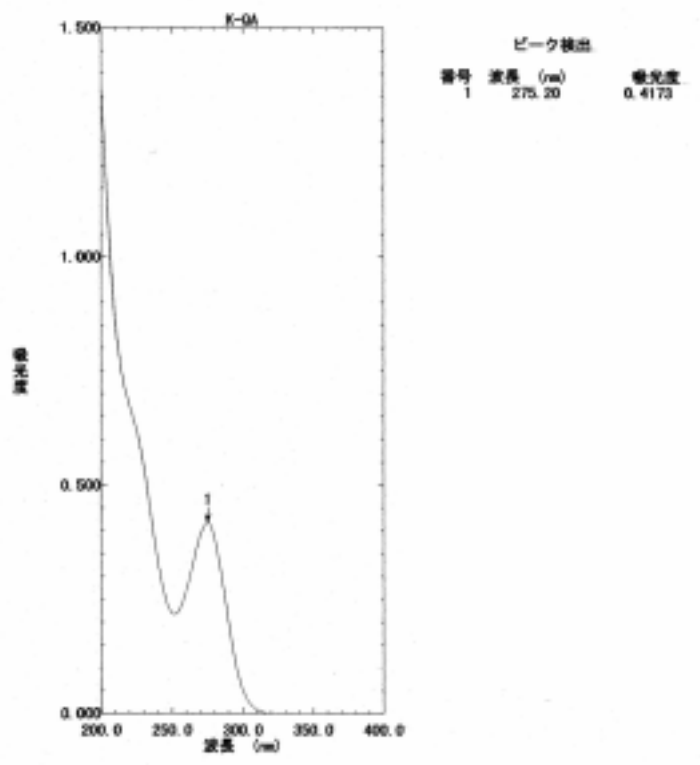


図 15 . キノリン酸の UV スペクトラム

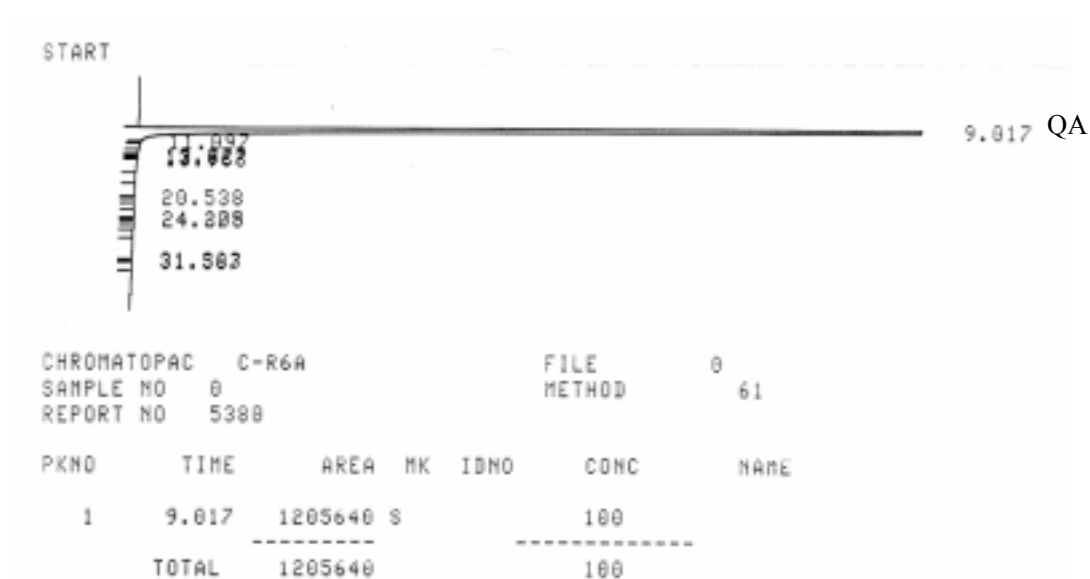


図 16 . 標準のキノリン酸の HPLC クロマトグラムの例

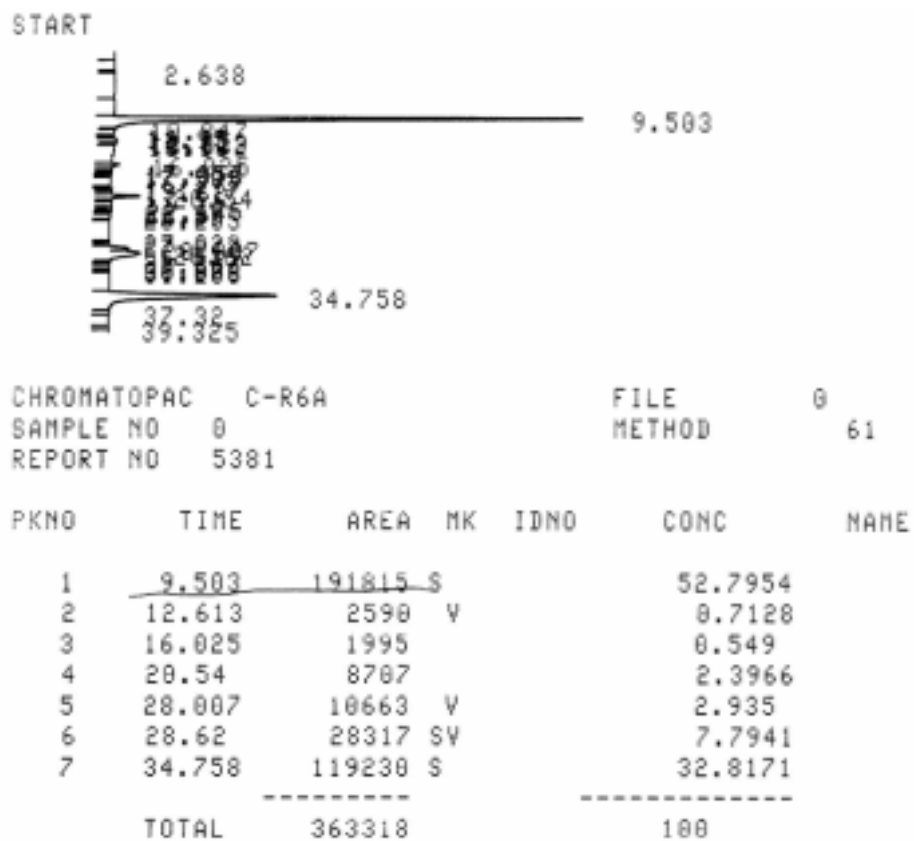


図 17 . 尿を試料としたときのキノリン酸の HPLC クロマトグラム の例