

## 高速液体クロマトグラフィーによるヒト角質層中のウロカニン酸の定量

大西 重樹, 西島 靖, 杉山 京子\*

(1976 年 2 月 25 日受理)

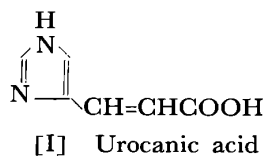
ポリビニルアセテートポラスポリマー (TSK ゲル LS-140) を固定相に用いる高速液体クロマトグラフィーによる微量のイミダゾール-4(5)-アクリル酸 (ウロカニン酸) の定量分析法について検討した。

ウロカニン酸は、カラム温度 20°C において、溶離液 (メタノール) に少量のトリエチルアミンを添加することによって HETP の減少が認められ、対称性のあるピークとして溶出する。(17~68) ng の範囲で作成した検量線は原点を通る直線となり、既知濃度試料での回収率も良好であった。

又、ヒト表皮よりウロカニン酸の抽出条件について検討した結果、水を抽出溶媒とするとき、数十秒以内に平衡に達し、皮膚を傷つけることなく十分定量可能であった。

### 1 緒 言

ヒト皮膚中のイミダゾール-4(5)-アクリル酸 [I] (ウロカニン酸: ヒスチジンの代謝中間産物) は紫外線から皮膚を保護する働きをしている<sup>1)2)</sup>。角質層中のウロカニン酸は、一般にヒト表皮よりはく離れた角質層より水で抽出され、カラムクロマトグラフ法<sup>3)</sup>、薄層クロマトグラフ法<sup>4)</sup>などで分離された後吸光度法によって定量されている。しかしながら、これらの方法は試料の採取が困難なうえ、分析にも長時間を要する。



著者らはヒト皮膚中のウロカニン酸の挙動に関する研究の一環として、ヒト表皮より直接微量のウロカニン酸を抽出定量する方法の検討を行った。その結果、ウロカニン酸が紫外部に強い吸収を有すること、抽出量が極微量であることから、UV モニターを備えた高速液体クロマトグラフ法が適していると考え、詳細な検討を加えた。すなわち、固定相としてポリビニルアセテートポラスポリマーゲルを、移動相としてトリエチルアミン (以下 TEA) / メタノールを用いる極微量のウロカニン酸の迅速な定量法を確立した。これに伴い、皮膚を傷つけ

ることなく表皮よりウロカニン酸を直接抽出定量することが可能であることを見いだしたので、ここに検討した結果をまとめて報告する。

### 2 試薬及び装置

#### 2.1 試 薬

ウロカニン酸は市販品 (田辺製薬製) を水より再結晶を繰り返し精製した後、105°C で 2 時間乾燥したものをを用いた。他の試薬は市販品特級をそのまま用いた。

#### 2.2 装 置

高速液体クロマトグラフは日立 635 型を、カラムは内径 2.1 mm, 長さ 50 cm のものを 2 本接続して用いた。充てん剤は種々検討した結果、TSK GEL LS-140 (東洋曹達製) を用い、カラムへの充てんは湿式法によって行った。

### 3 実験操作

ウロカニン酸の 7 µg/ml のメタノール溶液を調製し、約 5 µl をマイクロシリンジにとり、ストップフローインジェクション方式によりカラムに直接注入した。得られたクロマトグラムより保持時間、ピーク幅を測定し、理論段高さ (HETP) を計算した。

ヒト皮膚よりのウロカニン酸の抽出は温度調節可能なガラス容器 (Fig. 1) を用いて行った。すなわち、ガラス容器を皮膚上に圧接し、抽出溶媒 15 ml を正確に加え、一定時間抽出した後抽出液 10 ml を正確にとり、減圧下 (40°C) で溶媒を留去した後、メタノール (1~2)

\* 鐘紡株式会社化粧品研究所: 神奈川県小田原市寿町 5-3-28

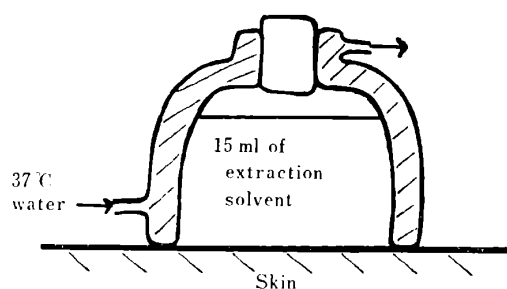


Fig. 1 Glass vessel for extraction

The extracted area was 8.55 cm<sup>2</sup>.

ml を正確に加えて溶かし試料溶液とした。

#### 4 結果及び考察

##### 4.1 分析条件の検討

**4.1.1 溶離液** メタノールを溶離液としたとき, ウロカニン酸は溶出されるがテーリングが起こり微量の検出は困難であった。そこで対イオンとしてメタノールに TEA を 1% 添加したところテーリングは消え対称性のあるピークを得たので最適アルカリ量について検討した。添加 TEA 量 0.1% から HETP は減少し, 0.5% から 1.0% の間でほぼ一定の値を示したので, 以後添加する TEA 量は 0.75% とした。

**4.1.2 カラム温度** 20°C から 60°C のカラム温度内での HETP の変化を調べた。一般にカラム温度が低いほど HETP は減少する傾向を示した。実験操作などを考慮してカラムの最適温度は 20°C であるとした。

**4.1.3 流速の影響** 溶離液の流速を 0.1 ml/min から 0.8 ml/min まで変化させたときの HETP について検討した。0.1 ml/min から 0.6 ml/min まではほぼ一定の値を示したが 0.7 ml/min 以上ではやや増大する傾向が認められた。これはストップフローインジェクションを行っているため試料注入後一定圧力 (0.8 ml/min で約 160 kg/cm<sup>2</sup>) に到達する間に試料の拡散が起こることも一因であると考えられる。分析時間, 圧力及び定量性を考慮し, 流速は 0.5 ml/min を選んだ。

**4.1.4 検量線の作成** ウロカニン酸の 17.1 µg/ml メタノール溶液を用い, その (1~4) µl の間で検量線を作成した (ピーク高さ法)。検量線は検討した範囲内で原点を通る直線であった。なお, 溶離液中におけるウロカニン酸の極大吸収波長である 277nm を検出波長に用いるとき, 検出限界は 5 ng であった。

**4.1.5 回収率の検討** ウロカニン酸の 0.855 ppm 水溶液 10 ml を正確にとり, 水を減圧下 (40°C) で留去した後, 2 ml のメタノールを正確に加えて溶かし試

Table 1 Recoveries of urocanic acid

|   | Present (ppm) | Found (ppm) | Recoveries (%) |
|---|---------------|-------------|----------------|
| 1 | 0.855         | 0.802       | 95.3           |
| 2 | 0.855         | 0.825       | 96.5           |
| 3 | 0.855         | 0.860       | 100.6          |
| 4 | 0.855         | 0.850       | 99.4           |

$\bar{x}$  = 98.0%; c. v. (%) = 2.52

料溶液とした。結果を Table 1 に示した。

##### 4.2 ヒト角質層中のウロカニン酸の定量

**4.2.1 抽出条件の検討** 前腕屈折部より 3 の操作に従い, 37°C の恒温下, 抽出溶媒として水-エタノール系について検討した結果を Table 2 に示した。水を用いたとき最もよく抽出された。次に水を抽出溶媒としたときの抽出時間について検討した結果を Fig. 2 に示した。約 10 秒で抽出量は飽和に達した。これは極性の大きな水分子が非常に早く角質層中に浸透するためであると考えられる。本実験では誤差などを考慮して抽出時間は 2 分と定めた。

Table 2 Effect of ethanol concentration to urocanic acid extraction

| Solvent        | 100/0† | 90/10 | 80/20 | 60/40 |
|----------------|--------|-------|-------|-------|
| Relative value | 100    | 71    | 63    | 62    |

† Water/Ethanol

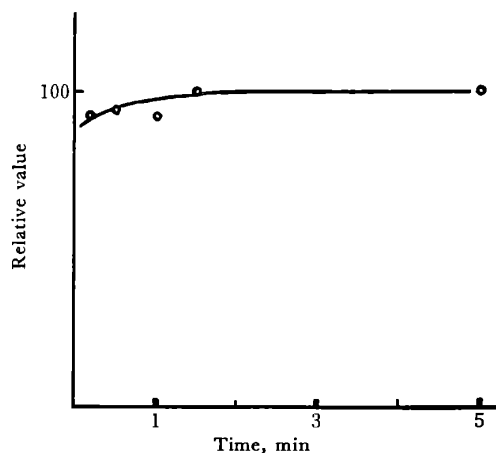


Fig. 2 Extraction time

**4.2.2 ピーク成分の同定** ヒト角質層抽出液のクロマトグラムを Fig. 3 に示した。クロマトグラムから明らかなように単一のピークを与えたのみで, その保持時間はウロカニン酸標準品と同一であった。又, 分取成分の紫外部極大吸収波長は 277nm (0.75% TEA/メタノール)

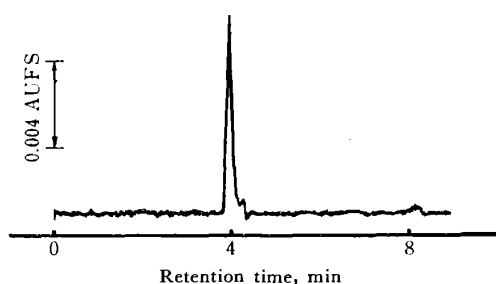


Fig. 3 High speed liquid chromatogram of extract from human epidermis

Column: TSK GEL LS-140 2.1 mm $\phi$   $\times$  1 m; Eluent: 0.75% (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N/CH<sub>3</sub>OH; Flow rate: 0.5 ml/min; Detector: UV Photometer (277 nm); Column temperature: 20°C

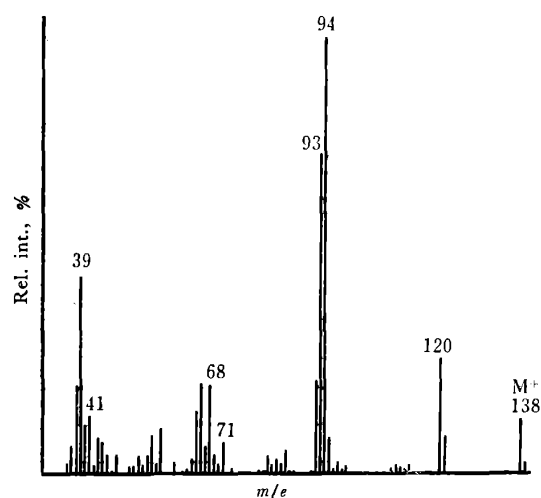


Fig. 4 Mass spectrum of peak component extracted from human epidermis

ール溶液), 265nm (希塩酸溶液) でありウロカニン酸の標準品に一致したこと及び質量分析の結果 (Fig. 4) 標準品と一致したことより同ピークをウロカニン酸と同定した。なお, 他の水溶性成分である尿素, アミノ酸などのクロマトグラフの挙動については明らかでない。

**4.2.3 定量結果** 年令 19 才から 40 才までの健康な成人男女 7 人の前腕屈折部における測定結果を Table 3 に示した。なお, Hais<sup>4)</sup> の文献は角質のはく離切断法

Table 3 Urocanic acid contents in the forearm epidermis

| Sex    | Age | Urocanic acid contents ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) |
|--------|-----|------------------------------------------------------|
| Male   | 40  | 0.51                                                 |
| Male   | 27  | 0.50                                                 |
| Male   | 26  | 0.35                                                 |
| Male   | 19  | 1.85                                                 |
| Female | 24  | 0.38                                                 |
| Female | 24  | 0.21                                                 |
| Female | 20  | 0.53                                                 |

で結果を出している。

又, 同一ヒトの左右の前腕屈折部における定量結果を Table 4 に示した。更に, 前腕屈折部, 背部, きょう部における定量結果を Table 5 に示した。

Table 4 Urocanic acid contents in the human epidermis (1)

| Human materials | Left ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) | Right ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) |
|-----------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| No. 1           | 0.45                               | 0.48                                |
| No. 2           | 0.69                               | 0.76                                |
| No. 3           | 0.54                               | 0.54                                |
| No. 4           | 0.78                               | 0.54                                |

Table 5 Urocanic acid contents in the human epidermis (2)

| Human materials | Forearm ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) | Back ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) | Cheek ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) |
|-----------------|---------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| No. 1           | 0.48                                  | 0.27                               | 0.33                                |
| No. 2           | 0.63                                  | 0.27                               | 0.94                                |
| No. 3           | 0.39                                  | 0.54                               | 0.45                                |

Table 4 及び 5 から明らかなように, 部位によるウロカニン酸存在量の差を考えると, 左右両腕の定量結果は比較的よく一致していると考えられることから, 同法はヒト角質層中のウロカニン酸定量に十分応用可能であると考えられる。

終わりに, 本研究の発表を許可された鐘紡株式会社常務取締役化粧品研究所長二子石広猛氏並びに本論文を御校閲頂きました千葉大学薬学部坂口武一教授に深謝の意を表します。

(1975 年 10 月 2 日, 日本分析化学)  
(会第 24 年会において一部講演)

## 文 献

- 1) A. Zenisek, J. A. Kral, I. M. Hais: *Biochim. Biophys. Acta*, **18**, 589 (1955).
- 2) J. A. Kral, M. Kutova, A. Zenisek, I. M. Hais: *Ceskoslovenska Dermatologie*, **33**, 289 (1958).
- 3) J. H. Anglin, A. T. Bever, M. A. Everett, J. H. Lamb: *Biochim. Biophys. Acta*, **53**, 408 (1961).
- 4) I. M. Hais, A. Strych: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **34**, 649 (1969).

☆

**Determination of urocanic acid in the human epidermis by high speed liquid chromatography.** Shigeki OHNISHI, Yasushi NISHIJIMA and Kyoko SUGIYAMA (Kanebo, Ltd., Cosmetic Laboratory, 5-3-28, Kotobuki-cho, Odawara-shi, Kanagawa)

Trace amounts of imidazole-4(5)-acrylic acid (urocanic acid) in the human epidermis were determined by high speed liquid chromatography using a polyvinylacetate porous polymer (TSK GEL LS-140) as a column packing. Eluent composition, column

temperature and flow rate were investigated in correlation with HETP, and the following conditions were established; eluent=0.75% triethylamine in methanol; column temperature=20°C; flow rate=0.5 ml/min. The column effluent was monitored at 277 nm which was a maximum absorption wavelength of urocanic acid in eluent. The limit of detection was 5 ng. Employing this analytical method, the extractive conditions (solvent and extraction time) of urocanic acid from the human epidermis were also examined. The urocanic acid in the human epidermis was extracted within about 10 seconds with water. The peak component was identified by ultra violet absorption spectra and mass spectrometry with that of urocanic acid. The

urocanic acid contents measured by this method in the human epidermis of forearm were (0.21~1.85)  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

(Received Feb. 25, 1976)

### Keywords

High speed liquid chromatography

Human epidermis

Imidazole-4(5)-acrylic acid

Urocanic acid

## 原子吸光分析法による葉酸の間接定量法\*

喜谷 喜徳, 中村 耕治, 稲垣 健治\*\*

(1976 年 2 月 12 日受理)

葉酸を過マンガン酸カリウムで酸化分解後, 硫酸ニッケルを加え, バソフェナントロリン (bathophen) 共存下, MIBK で抽出すると, 酸化分解により生成する 2-アミノ-4-ヒドロキシプテリジン-6-カルボン酸がニッケルと錯体を生成して, 選択的に MIBK 相に抽出される. そこで原子吸光分析法によりニッケルを定量し, 間接的に葉酸を定量する方法を検討した. 定量条件は, pH 8.5 のほう砂-硫酸緩衝液を使用し, ニッケル濃度を葉酸濃度の約 6.6 倍以上, bathophen 濃度を約 44 倍以上とすることにより, 葉酸 (1.2~20.0)  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度範囲で, 吸光値と葉酸濃度との間によい直線関係が得られた.

本法の繰り返し精度は標準偏差 1.77 (相対標準偏差 1.76%) であった. 従って, 本法は葉酸の定量に十分使用できるものと考えられる.

### 1 緒 言

原子吸光分析法による医薬品の定量に関する研究の一環として, 葉酸の定量を行った. 葉酸は核酸塩基の生合成などに関与するビタミンで, 造血薬として使用されている重要な医薬品である.

葉酸の定量法には, 過マンガン酸カリウムで酸化分解の後, 生成する 2-アミノ-4-ヒドロキシプテリジン-6-カルボン酸 (acid 1) の発するけい光を利用するけい光法<sup>1)</sup>, パラアミノ安息香酸 (PABA), パラアミノベンゾ

イルグルタミン酸 (PABAG) などの遊離アミンのジアゾカップリング反応を利用した比色法<sup>2)</sup>, ポーラログラフ法<sup>3)</sup>, アゾトメトリー<sup>4)</sup>, 又 *Lactobacillus casei* (ATTC 7469) を用いる微生物定量法<sup>5)</sup> などが報告されている.

著者らは, 葉酸を過マンガン酸カリウムで酸化分解し, 二酸化マンガンを汙別後, 汙液に硫酸ニッケルを加え, バソフェナントロリン (bathophen) 共存の下, メチルイソブチルケトン (MIBK) で抽出すると, acid 1 のニッケル錯体が抽出されることを見いだした. そこで MIBK 相中のニッケルを原子吸光法で測定することによる葉酸の間接定量法を検討した.

### 2 装置及び試薬

#### 2.1 装 置

日立 207 型原子吸光分光光度計を用い, 光源は日立

\* 原子吸光分析法による微量医薬品の定量 (第 9 報). 前報は喜谷喜徳, 中村耕治, 稲垣健治, 小池 久: 本誌, 24, 742 (1975)

\*\* 名古屋市立大学薬学部: 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通 3-1