

硫酸イオン分析計を用いたヒト尿，血清中の無機硫酸イオン及び結合型硫酸基の定量

田辺信三， 戸井田敏彦， 今成登志男*[®]， 大久保登， 宮崎元一**

(1980 年 1 月 29 日受理)

硫酸イオン分析計を用いて尿，血清中の無機硫酸イオンと結合型硫酸基を測定するための諸条件を検討した。

尿の場合，無機硫酸イオンは 5 倍希釈尿 10 μ l を直接分析計に注入して測定した。結合型硫酸基は 3 N 塩酸で 100 °C，60 分間加水分解した後，過剰の塩化物イオンを酸化銀で処理した上澄液 10 μ l を注入した。

血清についてはトリクロロ酢酸 (TCA) と有機溶媒による除たん白法を検討し，20 % TCA が良い結果を与えた。血清中の無機硫酸イオンは 20 % TCA で除たん白した上澄液 100 μ l を，又結合型硫酸基は除たん白上澄液を 3N 塩酸で 100 °C，120 分間加水分解した後尿の場合と同様酸化銀処理を行い，その上澄液 100 μ l を分析計に注入し測定した。

本法での回収率は (98.4~103.6)% と良好な結果を与えた。又，本法を用いて健康人血清，尿中の無機硫酸イオン及び結合型硫酸基の分析を行った。

1 緒 言

生体中の硫酸イオンのほとんどは無機硫酸イオン及びアルコール，フェノール，多糖類などとエステル結合した硫酸基として存在している。これら硫酸イオンを測定することは，硫黄化合物^{1)~4)}や含硫アミノ酸⁵⁾の吸収，代謝，排泄，じん機能との関係⁶⁾⁷⁾，代謝調節に伴う生体内輸送との関係⁸⁾などを知るうえで興味がある。

今まで塩化バリウム，ベンジジン，クロラニル酸バリウムによる沈殿法，比濁法，滴定法及び比色法が尿中の硫酸イオン測定に用いられてきたが⁹⁾，血清，血しょうでは検体を多量に必要とし，又測定法も煩雑でルーチン法としては適当でなかった^{10)~14)}。その後ロジゾン酸による高感度な比色法が開発され，尿に対する微量化はある程度可能になったが¹⁵⁾，血清では塩化物などの妨害物質の影響により発色が不安定となり実際には利用できない¹⁶⁾¹⁷⁾。

本研究では最近開発された硫酸鉄(III)錯体の紫外外部吸収 (340 nm) を利用した検出系と高速液体クロマトグラフィーを応用した硫酸イオン分析計^{18)~20)}を用いて血清，尿中の無機硫酸イオンと結合型硫酸基の測定に対す

る諸条件を検討し，簡便でかつ感度良く測定できる方法を確立し，本法をヒト血清，尿中の硫酸イオン分析に応用した。

2 試薬及び装置

2.1 試 薬

硫酸ナトリウム標準溶液：硫酸イオンとして 480 mg/l の保存水溶液を調製し，適宜希釈して使用した。TCA 溶液：20 % 水溶液 (冷所保存)。フェノール硫酸溶液：文献記載の方法²¹⁾で合成し，1 mM 水溶液を調製した (用時調製)。酸化銀：粉末を使用した。塩化バリウム溶液：2 M 酢酸水溶液 10 ml，0.005 M 塩化バリウム水溶液 4 ml と 0.02 M 炭酸水素ナトリウム水溶液 8 ml を混合し，エタノールで 100 ml にする。ロジゾン酸ナトリウム溶液：5 mg のロジゾン酸二ナトリウム塩を 20 ml の水に溶かした後 100 mg の L-アスコルビン酸を加え良くかくはんし，エタノールで 100 ml にする。この溶液は調製後 30 分間暗所に放置して使用する (用時調製)。

実験に用いた試薬類は市販の特級品を，水はすべてイオン交換水を蒸留して使用した。

2.2 装 置

硫酸イオン分析計：盛進製薬(株)社製 S-04A 型を使用した。検出器はダブルビーム比色計 (340 nm の干渉フィルター，10 mm のフローセル付き)，定流量ポンプ

* 千葉大学薬学部：千葉県千葉市弥生町 1-33

** 金沢大学薬学部：石川県金沢市宝町 13-1

はボール弁ピストン方式の耐薬品、耐溶媒性のものを使用し、流速は 0.33 ml/min に調整した。比色計：日立分光光度計 181 型を使用した。

2.3 カラム

カラムは陰イオン分析に用いられる強塩基性陰イオン交換樹脂 TSK-222 (12 μ m, 東洋曹達製) をスラリー法で充てんした。カラム管は内径 3 mm, 長さ 200 mm のジャケット付きガラスカラムを用い、温度は 40 $^{\circ}$ C に調節した。

2.4 移動相

5 mM の硝酸鉄(III) を含む 0.1 M の硝酸水溶液を用いた²⁰⁾。

3 実 験

3.1 硫酸イオンのクロマトグラムと検量線

標準試料として 12.5 mM 硫酸イオンと 75 mM 塩化物イオンを含む水溶液 5 μ l を硫酸分析計に注入したときのクロマトグラムを Fig. 1 に示す。硫酸イオンは約 14 分、塩化物イオンは 20 分後に溶出される。リン酸イオンは溶媒先端に現れるが、それ以外の陰イオンは硫酸イオンの分析に対して障害しない。ピーク高さと硫酸イオンと塩化物イオンの感度を比較すると、モル濃度で約 5 倍硫酸イオンのほうが感度が良い。

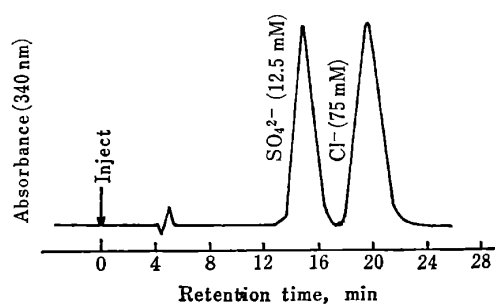


Fig. 1 Typical chromatogram of sulfate and chloride

Conditions—Column: TSK-gel LS-222 (3 mm i. d. $\times$ 200 mm), mobile phase: 5 mM $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ -0.1 M HNO_3 , column temperature: 40 $^{\circ}$ C, flow rate: 0.33 ml/min

次に硫酸イオンの濃度を 9.8 mg/l と一定にして、5 μ l, 10 μ l, 20 μ l, 30 μ l, 50 μ l, 75 μ l, 100 μ l と容量を変えてピーク高さと検量線を作成したところ 30 μ l で変曲点を示す検量線が得られたが、100 μ l ではその系から外れた。しかし注入量を 10 μ l と 100 μ l で一定にしてピーク高さと検量線を作成したところ、10 μ l では

$y = 1.974x - 0.039$ ($r = 0.999$, $n = 6$), 100 μ l では $y = 1.803x + 0.061$ ($r = 0.999$, $n = 6$) の回帰式を示す検量線が得られ、1 μ g までの硫酸イオンが定量可能であった。又、硫酸イオン 4.8 μ g を含む 10 μ l 及び 100 μ l の検体をそれぞれ分析計に注入したときの変動係数 (c.v.) はそれぞれ 0.42 % ($n = 10$), 2.68 % ($n = 10$) であった。

3.2 ヒト尿中の無機硫酸イオン及び結合型硫酸基の測定条件

3.2.1 無機硫酸イオンの測定操作 5 倍希釈尿 10 μ l を直接硫酸イオン分析計に注入したところ Fig. 2 に示すように、塩化物イオンの影響を受けず分離定量が可能であった。

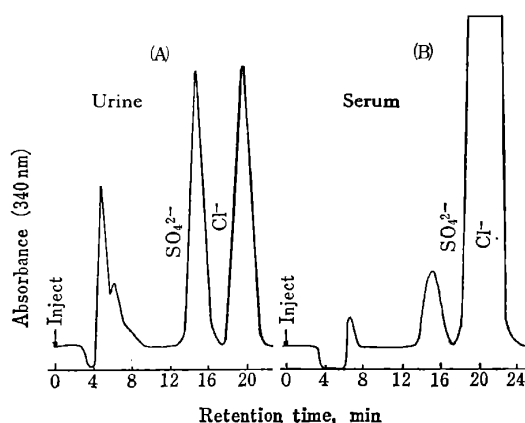


Fig. 2 Chromatograms of urine and serum

(A) Urine was diluted (1:4) with deionized water, and 10 μ l of the diluted sample was analyzed. (B) Serum was deproteinized (1:1) with 20 % TCA, and 100 μ l of the supernatant solution of the deproteinized sample was analyzed. Conditions—Column: TSK-gel LS-222 (3 mm i. d. $\times$ 200 mm), mobile phase: 5 mM $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ -0.1 M HNO_3 , column temperature: 40 $^{\circ}$ C, flow rate: 0.33 ml/min

3.2.2 結合型硫酸基の加水分解 結合型硫酸基は塩酸で加水分解して硫酸イオンとし、総硫酸イオンとして測定する。

そこで、3 N 塩酸 0.25 ml を用いて 5 倍希釈尿 0.5 ml を 1 ml のガラスアンプル中、封管後沸騰水浴中で 3 時間加水分解し、その 10 μ l を分析計に注入し硫酸イオンを測定したところ塩化物イオンの妨害を受けた。しかし酸化銀を用いて脱塩素を行い、その遠沈上澄液 10 μ l を分析したところ再現性良く硫酸イオンを測定することができた。塩化物イオン除去に要した酸化銀の量は 200 mg であった。この条件を用いて尿中の結合型硫酸基の加水分解時間を検討したところ、Fig. 3 に示すように 30 分

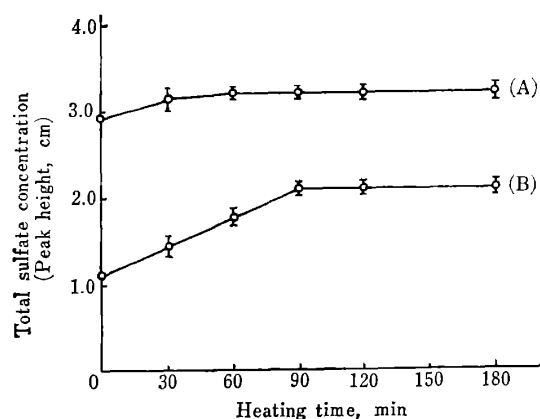


Fig. 3 Effects of heating time on hydrolysis of bound sulfate at 100 °C

(A) Urine; (B) Serum

で総硫酸イオン量が一定となったので, 加水分解時間は沸騰水浴中 1 時間とした。

3.2.3 結合型硫酸基の測定操作 以上の実験より, 尿中結合型硫酸基は次の操作で測定する。

5 倍希釈尿 0.5 ml と 3 N 塩酸 0.25 ml を 1 ml のガラスアンプルに注入し, 封管後 1 時間沸騰水浴中で加熱振とうする。室温に冷却後アンプルを開管し加水分解液を試験管に移し, この中に 200 mg の酸化銀を加え良く振とう後 3000 rpm で 5 分間遠心分離し, その上澄液 10 μ l を分析計に注入し総硫酸イオン量を測定する。尿中結合型硫酸基の濃度 = 総硫酸イオン濃度 - 無機硫酸イオン濃度

3.3 ヒト血清中の無機硫酸イオン及び結合型硫酸基の測定条件

3.3.1 除たん白の検討 血清中の硫酸イオンを測定する際の除たん白剤として TCA が一般に用いられている。しかし, 結合型硫酸化合物の中でも酸で加水分解されやすいものもある。

そこで, 常法である 20 % TCA と温和な除たん白剤と考えられる有機溶媒としてエタノール, アセトン, アセトニトリルについてそれらの除たん白効果を検討した。各除たん白剤について容量比を 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5 と変えて硫酸イオンの回収率を求めたところ Table 1 に示すように 20 % TCA ではどの比率でも (99 ~ 100) % の回収率を得たが, 有機溶媒ではどの種類でも 60 % 以下の回収率を示した。そこで 20 % TCA を除たん白剤として用いることにした。

3.3.2 TCA による結合型硫酸化合物の加水分解

比較的不安定な結合型硫酸化合物としてフェニル硫酸

Table 1 Effects of deproteinizing agents

Volume ratio serum : agent	Recovery (%)			
	20 % TCA	Ethanol	Acetone	Acetonitril
1 : 2	99.6	56.2	48.0	59.2
1 : 3	101.7	50.3	12.4	41.2
1 : 4	100.4	34.7	N. D.	24.4
1 : 5	100.7	21.9	N. D.	18.8

N. D. : Not detected

を用い, 20 % TCA による加水分解率を検討した。

冷 1 mM フェニル硫酸水溶液 0.5 ml に 20 % TCA 0.5 ml を加え室温と氷水中で 30 分間放置後その 100 μ l を採り, 遊離した硫酸イオンの量を測定し加水分解率を求めたところ, フェニル硫酸自身の分解は見られなかったが, TCA を入れて室温に放置したものは 10.2 %, 氷水中に放置したものは 1.2 %, 硫酸イオンに分解された。

3.3.3 無機硫酸イオンの測定操作 0.5 ml のヒト血清に 0.5 ml の脱イオン水と約 0 °C に冷却した 20 % TCA 液 0.5 ml を加え良くかくはんした後氷水中に 10 分間静置して除たん白を行う。次に 3000 rpm で 15 分間遠心分離した後その上澄液 100 μ l を分析計に注入して無機硫酸イオンを測定する。尿の場合と同様塩化物イオンの障害はみられない (Fig. 2)。

3.3.4 結合型硫酸基の加水分解時間 3.3.3 の操作で得られた除たん白上澄液 0.5 ml と 3 N 塩酸 0.25 ml を 1 ml のガラスアンプルに注入し, 尿の場合と同様な操作で総硫酸イオンを測定した。血清の場合は Fig. 3 に示すように約 90 分で総硫酸イオン量が一定となった。そこで加水分解時間は 120 分とした。

3.3.5 結合型硫酸基の測定操作 無機硫酸イオンを測定した残りの除たん白上澄液 0.5 ml と 3 N 塩酸 0.25 ml を 1 ml のガラスアンプルに注入し, 封管後 2 時間沸騰水浴中で加水分解する。室温に冷却後加水分解液を試験管に移し, 酸化銀 200 mg を加えた後良くかくはんし, 3000 rpm で 5 分間遠心分離しその上澄液 100 μ l を分析計に注入し総硫酸イオンを測定する。血清中結合型硫酸基の濃度 = 総硫酸イオンの濃度 - 無機硫酸イオンの濃度

4 実験結果及び考察

4.1 本法の正確度及び精度

血清及び尿に無機硫酸イオンとして硫酸カリウム, 結合型硫酸化合物としてフェニル硫酸カリウムを添加したときの回収率は Table 2 に示すように, 血清で (98.4 ~ 103.6) %, 尿で (99.3 ~ 100.6) % とほぼ 100 %

Table 2 Recoveries of inorganic and bound sulfate from urine and serum

	Mean recovery (%) (n=5)	c. v. (%)
Potassium sulfate (as inorganic sulfate) added		
to urine, mg/ml		
0.87	100.6	0.74
17.43	100.0	0.29
to serum, mg/dl		
1.74	98.4	6.70
17.43	99.5	3.75
Potassium phenyl sulfate (as bound sulfate) added		
to urine, mg/ml		
1.06	99.3	2.15
21.23	99.9	1.12
to serum, mg/dl		
1.06	103.6	6.70
21.23	98.6	4.80

に近い値を示し、又 c. v. は尿で (0.29~2.15)%, 血清で (3.75~6.70)% と良い結果を与えた。

4.2 他法との比較

ヒト尿中の無機硫酸イオンについて本法とロジゾン酸法¹⁶⁾との相関を検討したところ、Fig. 4 に示すように 14 例で回帰式 $y=0.920x+0.063$ 、相関係数 $r=0.986$ と良好な結果を得た。

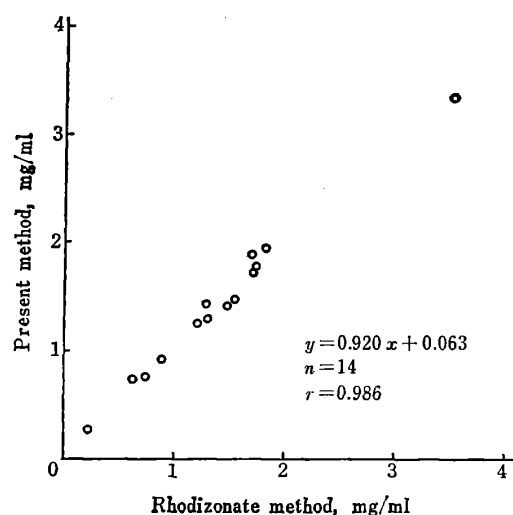


Fig. 4 Correlation between present method and rhodizonate method for determination of inorganic sulfate in human urine

Sample: Urine from 14 normal subjects

4.3 ヒト健康尿及び血清中の無機硫酸イオンと結合型硫酸基

健康人血清 8 検体、健康人尿 7 検体につき無機硫酸イオンと結合型硫酸基の測定結果を Table 3, Table 4 に示す。

Table 3 Concentration of inorganic and bound sulfate in normal human serum

Sample No.	Inorganic sulfate (mg/dl)	Bound sulfate (mg/dl)
1	3.05	1.40
2	3.72	1.67
3	3.45	1.14
4	3.04	1.99
5	3.76	1.36
6	3.56	1.17
7	3.23	1.32
8	3.62	1.94
Mean±SD	3.43±0.29	1.50±0.33

血清中無機硫酸イオンと結合型硫酸基の正常値はそれぞれ 3.43 mg/dl { (3.04~3.76) mg/dl, c. v.=8.5% }, 1.50 mg/dl { (1.14~1.99) mg/dl, c. v.=22% } と他法と一致した値を示した。特に無機硫酸イオンに関しては c. v. が 8.5% とばらつきが少なく個人差が小さいものと考えられる。

Table 4 Concentration of inorganic and bound sulfate in normal human urine

Sample No.	Inorganic sulfate (mg/ml)	Bound sulfate (mg/ml)
1	2.85	0.49
2	1.49	0.31
3	0.77	0.07
4	0.28	0.08
5	1.42	0.38
6	1.78	0.28
7	1.29	0.21
Mean±SD	1.41±0.81	0.26±0.15

一方、尿中の無機硫酸イオン及び結合型硫酸基の値は個人差が大きい (無機硫酸イオン: c. v.=57.4%, 結合型硫酸基: c. v.=57.7%)。今回の実験では 1 日尿を用いて分析しなかったため尿量による変化が考えられるが、しかし食事などの影響も無視できない。

5 結 語

硫酸イオン分析計を用いて血清、尿中の無機硫酸イオン及び結合型硫酸基を測定するための前処理法を検討し、健康人血清、尿の分析を行った。

本法で用いる検体量は血清で 250 μ l, 5 倍希釈で 10 μ l と従来の方法に比べて 1/16~1/5 と微量で済む。又, 硫酸イオンはカラムクロマトグラフィーで分離されるため妨害物質の影響を受けず特異的に測定され, 特に血清に対しては操作も他法に比べて簡便で十分臨床分析に適用できる方法である。

終わりに, 本研究を行うに当たり硫酸イオン分析計の利用に便宜をはかっていただいた盛進製薬(株)に感謝します。

文 献

- 1) J. D. Gregory, P. W. Roffins : *Ann. Rev. Biochem.*, **29**, 347 (1960).
- 2) R. Lotmar : *Chem. Zentr.*, **129**, 2493 (1958).
- 3) F. Egami, M. Ishimoto : *Proc. Intern. Congr. Biochem.*, 5th, Moscow, **3**, 327 (1961).
- 4) W. J. O'Connor, R. A. Summerill : *J. Physiol.*, **260**, 597 (1976).
- 5) 岩田平太郎, 栗山欣弥 : “タウリン—その代謝と生理薬理作用”, p. 33 (1975), (医歯薬出版).
- 6) F. Berglund, S. Sörbo : *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **12**, 147 (1960).
- 7) D. W. Seldin, A. J. Coleman, N. W. Carter, F. C. Rector, Jr. : *J. Lab. Clin. Med.*, **69**, 893 (1967).
- 8) F. Lipmann : *Science*, **128**, 575 (1958).
- 9) R. Belcher : *Mikrochim. Acta*, **1977** (II), 81.
- 10) S. B. Guerrero : *Anales Fac. Quim. y Farm., Univ. Chile.*, **10**, 30 (1958). (Chem. Abstr., **54**, 5797, 1958).
- 11) K. G. Hogan, J. N. Breen : *New. Zeal. and J. Agr. Research*, **3**, 498 (1960). (Chem. Abstr., **54**, 25008, 1960).
- 12) A. A. Safavova : *Lab. Delo.*, **7**, 411 (1966).
- 13) J. H. Holmes, E. S. Miller, C. J. Hlad, Jr. : *Trans. Am. Soc. Artificial Internal Organs*, **6**, 163 (1960).
- 14) I. P. T. Hakkinen, L. M. Hakkinen : *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **11**, 294 (1959).
- 15) A. Swaroop : *Clin. Chim. Acta*, **46**, 333 (1973).
- 16) P. Balatre : *Ann. Biol. Clin.*, **24**, 689 (1966).
- 17) A. Waheed, R. L. VanEtten : *Anal. Biochem.*, **89**, 550 (1978).
- 18) 中柴篤男, 降矢一美, 三方鶴雄, 中山 実 : 日化, **1976**, 1426.
- 19) 中柴篤男, 降矢一美, 三方鶴雄, 中山 実 : 日化, **1977**, 1655.
- 20) 中柴篤男, 降矢一美, 中山 実 : 日化, **1978**, 217.
- 21) J. Feigenbaum, C. A. Neuberg : *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 3529 (1941).

☆

Determination of inorganic and bound sulfate in human urine and serum with a sulfate ion analyzer. Shinzo TANABE, Toshihiko TOIDA, Toshio IMANARI*, Noboru OKUBO and Motoichi MIYAZAKI** (*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, 1-33, Yayoi-cho, Chiba-shi, Chiba; **Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, 13-1, Takara-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa)

The determination method of inorganic and bound sulfate in human urine and serum was investigated in detail with a sulfate ion analyzer, and the following procedure has been established: For the determination of inorganic sulfate in urine, 10 μ l of 5-fold diluted urine with deionized water was applied directly to the column. For the bound sulfate, 0.5 ml of 5-fold diluted urine was transferred to 1 ml of glass ampoules and to this 0.25 ml of 3 N HCl was added. After heating the sealed ampoule for 60 min at 100 °C, the mixture was taken into a centrifuged tube. Then, 200 mg of Ag₂O was added to the tube and it was centrifuged for 5 min. Ten μ l of the supernatant solution was applied to the column, and the amount of total sulfate was measured. The amount of bound sulfate was calculated by the difference between the amounts of total sulfate and inorganic sulfate. For the determination of inorganic sulfate in serum, 0.5 ml of serum was diluted to 1 ml with deionized water and to this 0.5 ml of cold 20 % trichloroacetic acid (TCA) was added. After 10 min the mixture was centrifuged for 15 min and 100 μ l of the supernatant solution was applied to the column. For the bound sulfate, 0.5 ml of above supernatant solution was transferred to 1 ml of glass ampoules and 0.25 ml of 3 N HCl was added. The sealed ampoule was heated for 120 min at 100 °C. Later procedure was as same as the determination of bound sulfate in urine, and 100 μ l of the supernatant solution was applied to the column. Recoveries of inorganic and bound sulfate for human serum and urine by the present method were satisfactory, in (98.4~103.6) % and (99.3~100.6) %, respectively. The average amounts of inorganic and bound sulfate in serum of normal persons ($n=8$) were 3.43 mg/dl {(3.04~3.76) mg/dl} and 1.50 mg/dl {(1.14~1.99) mg/dl}, respectively, which are agreeable with the other data. The amounts of inorganic and bound sulfate in urine varied greatly.

(Received Jan. 29, 1980)

Keywords

Bound sulfate
Inorganic sulfate
Serum
Sulfate ion analyzer
Urine