

## 蛍光検出逆相イオン対 HPLC による尿中の微量アルミニウムの分析

日大生産工 (院) ○小屋原和彦 白鳥製薬 三品亜衣  
日大生産工 西垣敦子 齊藤和憲 渋川雅美

### [緒言]

アルミニウムは自然界において鉱物や土壌、水、大気中の粉塵、植物、動物体内などに、さまざまな形態で存在しており、アルミニウムを大量に摂取すると神経毒性を示し、中枢神経障害によって記憶障害を引き起こすことが報告されている<sup>1)2)</sup>。そのため医学・生化学・環境科学の諸分野で、血液や尿などの生体試料や土壌・河川水などの環境試料中に溶解した極微量のアルミニウムを迅速かつ正確に測定することが求められている。これまで本研究室では、錯形成試薬として5-スルホ-8-キノリノール (HQS) を用いた吸光検出逆相イオン対 HPLC により、水道中のppbレベルのアルミニウムの定量<sup>3)</sup>、及び蛍光検出逆相イオン対 HPLC 法による河川水中の極微量のアルミニウムの定量<sup>4)</sup>に成功した。さらに、より低濃度で存在する尿試料中のアルミニウムの定量を行うための前処理法について検討を行ってきたが、共存物の影響により定量が困難であった。

そこで本研究では、蛍光検出逆相イオン対 HPLC による尿試料中の微量アルミニウムの定量を目的とし、尿試料の前処理及び定量について検討を行った結果を報告する。

### [実験]

大気中からのアルミニウムの汚染を防ぐため、全ての実験をクラス 100 のクリーンルームで行った。また、ガラス器具からのアルミ

ニウムの汚染を防ぐため、溶液調製には全てポリプロピレン製の容器及び器具を使用した。蛍光検出器は SHISEIDO 製 NANOSPACE CL-2 を使用し、励起光波長を 366 nm , 蛍光検出波長を 510 nm とした。カラムは東京化成製 Kaseisorb LC ODS 2000 (4.6 mm I.D.× 150 mm )を使用し、溶離液には 70 mM NaCl , 7 mM TBABr , 0.3 mM HQS 及び 10 mM Bis-Tris 緩衝液 (pH 7.0) を含む 18% (w/v) アセトニトリル-水混合溶液を使用した。Fig.1 に HPLC システムの概略を示す。アルミニウム標準溶液は、原子吸光分析用アルミニウム標準溶液 (1000 ppm) を溶離液で希釈し用いた。尿試料は 0.1 M になるように硝酸を添加しメンブランフィルターでろ過後、完全乾固し、残渣を 1 mM 塩酸 1 ml で溶解した。これを溶離液で希釈して分析試料とした。尿試料の定量は標準添加法及び絶対検量線法より求めた。

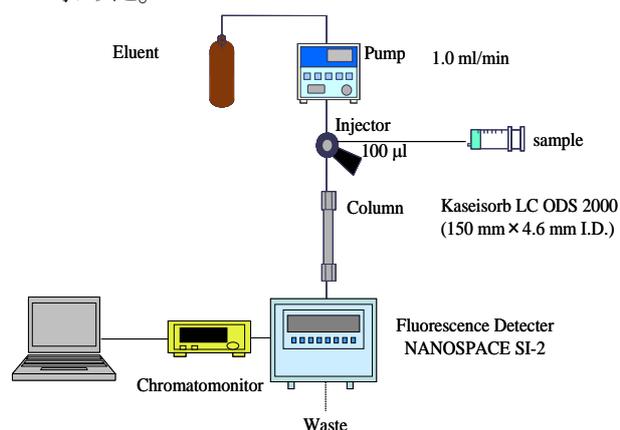


Fig.1 Schematic diagram of HPLC system

Determination of trace amounts of aluminum in urine samples by reversed-phase  
ion-pair HPLC with fluorescence detection

Kazuhiko KOYAHARA, Ai MISHINA, Atsuko NISHIGAKI, Kazunori SAITOH and Masami SHIBUKAWA

### [結果及び考察]

クラス 100 のクリーンルーム内で実験を行うことで、アルミニウム汚染を最大限に排除した条件下で、安定したクロマトグラムを得ることができ、検出限界はブランクピークの高さの標準偏差の3倍より0.018ppbと低い値を得ることができた。尿試料をポリプロピレン製ビーカーを用いて温浴で完全乾固させ、1mM塩酸を加え残渣を溶解させた後、溶離液で調製して測定を行った結果、Fig.2 (a)に示すクロマトグラムが得られた。尿試料の前処理が不十分であったため尿中に共存する有機物の影響によりクロマトグラムが乱れ、7~8分に溶出するアルミニウムのピークと夾雑物のピークが重なりアルミニウムの定量を行うことができなかった。そこで、尿試料をより完全に分解するため、硝酸-過酸化水素を添加し、石英るつぼを用いてホットプレート上で加熱した。その結果、Fig.2 (b)に示した良好なクロマトグラムが得られた。これは、硝酸-過酸化水素処理によって尿試料中に共存する有機物分解が促進されたためと考えられる。尿中に存在するアルミニウム濃度は標準添加法(1.3 ppb)及び、絶対検量線法(1.1 ppb)ともに良く一致した定量値を得ることができた。

また、尿試料の前処理時間の短縮を行うため固相抽出カートリッジ(Aquisis PLS-3)を用いて固相抽出を行った後、硝酸-過酸化水素による酸処理を行った。その結果、カートリッジ内には尿中の色素成分が吸着され、前処理に要する時間も22時間から14時間へと短縮された。Fig.2 (c)に得られたクロマトグラムを示す。尿中に存在するアルミニウム濃度は標準添加法(3.1 ppb)及び、絶対検量線法(2.6 ppb)ともに良く一致した定量値が得られたことから、尿試料中のアルミニウムの分離・定量が可能であることが示された。

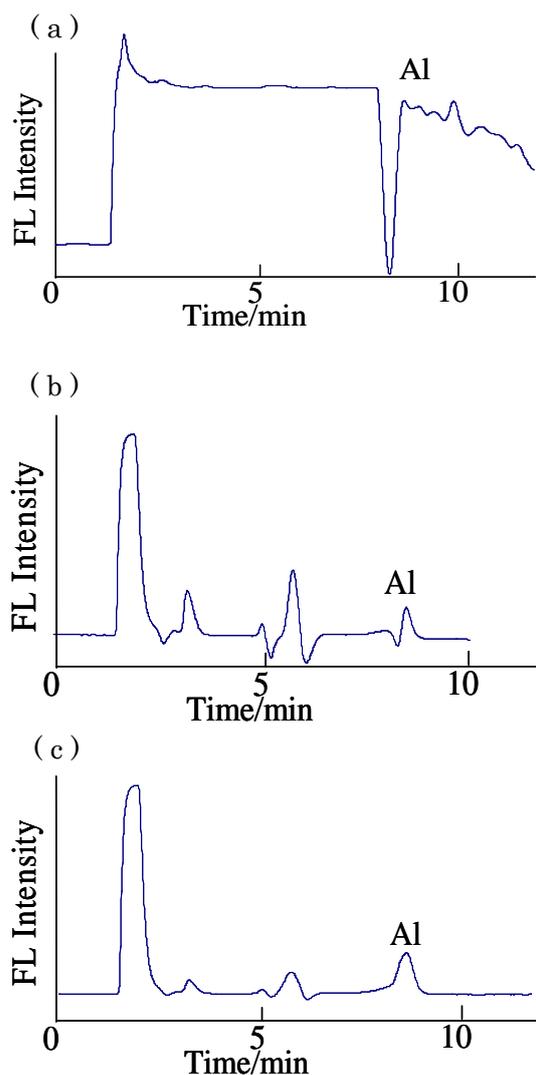


Fig.2 Chromatograms of aluminum in urine samples pretreatment: ( a )HNO<sub>3</sub> ( b ) HNO<sub>3</sub> - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( c )solid-phase extraction followed by HNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 【参考文献】

- 1)T.P.Flaten,A.C.Alfrey,J.D.Birchall,J.Savory,R.A.Y okel : J.Toxicol.EnvIRON.Health,**48**,527(1997)
- 2)World Health Organization. Environmental Health Criteria 194.Aluminium.Geneva:WHO(1997)
- 3)岩野真希,平野愛弓,西垣敦子,渋川雅美 :分析化学 , vol. 52 , No. 9 , 719 – 724 ( 2003 )
- 4) 小屋原和彦,三品亜衣,西垣敦子,齊藤和憲,渋川雅美 :日本分析化学会第54年会講演要旨集,P1067,287(2005)