

界面活性剤水溶液の相分離現象を用いる尿中ビリルビンの分離・濃縮

松戸 俊之,^a 齋藤 徹,^{*,b} 松原 チヨ^a東京薬科大学生命科学部,^a名古屋大学大学院工学研究科,^b

Micelle-Mediated Extraction for Concentrating Conjugated Bilirubin in Urine

Toshiyuki MATSUDO,^a Tohru SAITOH,^{*,b} and Chiyo MATSUBARA^aTokyo University of Pharmacy and Life Science,^a 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392,Japan and Graduate School of Molecular Design and Engineering, Nagoya University,^b

Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603, Japan

(Received August 7, 2000; Accepted November 15, 2000)

An extraction method based on the phase separation of aqueous micellar solutions of n-octyl- β -D-thiogluco-*s*ide (OTG) was applied to the concentrating conjugated bilirubin in urine. The analyte in sample solutions could be efficiently concentrated into a small volume of surfactant-rich phase, while hydrophilic matrix components including urinary protein, ascorbic acid, and saccharide remained in the aqueous phase. The concentrated OTG negligibly affected the diazo reaction and the subsequent spectrophotometric detection. Conjugated bilirubin was successfully determined in the concentration range from 0.05 μ g/ml to 5 μ g/ml with a 96-well microplate reader absorption spectrophotometer.

Key words—micelle-mediated extraction; conjugated bilirubin; urine; diazo reaction; octyl- β -D-thiogluco-*s*ide

1. 緒言

尿中ビリルビン (BR) の測定は、肝障害や肝胆道系の障害の把握や経過観察の一助として有効であり、今日では主にジアゾ化反応に基づく試験紙法や錠剤法による定性検査が広く行われている。しかし、尿中 BR は微量である上に、アスコルビン酸などの尿中還元性共存物質がジアゾ化反応を阻害するため、²⁾尿中 BR の定量検査が行われることは少ない。したがって、尿中 BR を速やかに分離・濃縮し、定量検査に供する方法の確立は診断確度の向上に寄与できるものと考えられる。尿や血清など生体関連試料中からのビリルビンの抽出方法としては、クロロホルムのような有機溶媒を用いる液液抽出法が広く用いられているが、³⁾煩雑な操作を必要とするばかりでなく、有害な有機溶媒を多量に使用するため、人体や環境への悪影響も懸念される。このため、有機溶媒を用いず、簡易迅速かつ高効率で実施できる抽出系が望まれる。

近年、著者らは非イオン界面活性剤の1つである n-オクチル- β -D-チオグルコシド (OTG) のミセル水溶液による疎水性化合物の抽出分離法を提案してきた。⁴⁾この方法は、ポリエチレングリコール (PEG) の存在下、OTG ミセル水溶液が水相と界面活性剤相の二相に相分離し、その際、水中に可溶化されている疎水性物質が界面活性剤相に分配することに基いている。本法は簡易迅速である上に、相

分離の際に温度を変化させる必要がないことから、熱に弱い生体成分を含む試料の抽出方法として高い有用性を持つと考えられる。本研究では、抱合型ビリルビンの水相-界面活性剤相間の分配を調べ、本抽出法を用いる尿中 BR の定量法を検討した。

2. 実験

2-1. 試薬 OTG (同仁化学研究所製)、PEG (平均分子量 7,500, 和光純薬製) は、20% (w/v) 水溶液とした。BR 標準物質としては、フナコシ社製の Bilirubin Conjugate (Ditaurate 2Na) を使用した。コントロール尿は、Sigma 社製の Urinary metabolite lyophilizate を使用した。BR のジアゾ化試薬は、和光純薬製のビリルビン BII-テストワコーを使用した。

2-2. BR の抽出及び定量 1.5 ml の遠心チューブに、BR (0.05~5 μ g/ml) を含む尿試料 650 μ l, OTG 水溶液 100 μ l, PEG 水溶液 250 μ l を入れて混和した後に、4°C で 5 分間遠心分離 (6,500 rpm) して相分離させた。界面活性剤相 20 μ l をシリンジで採取して 96 穴 ELISA 用マイクロプレート穴中に入れ、そこにビリルビン BII-テストワコー中の発色試薬 A, B をそれぞれ 60 μ l ずつ添加した。マイクロプレートミキサーを用いて溶液を混合させ、室温で 20 分放置後、発色試薬 C を 60 μ l 添加し、マイクロプレートリーダーにより 600 nm における吸光度を測定した。

Table 1. Recoveries of Some Compounds to Surfactant-Rich Phase

Compound	Recovery (%)
BR ^{a)}	62.3 ± 0.7
Urinary proteins	1.7 ± 0.1*
Ascorbic acid ^{b)}	0.9 ± 0.8**
D-Saccharic acid 1,4-lactone ^{c)}	2.4 ± 0.5***

Values represent the mean ± SE (n=5). a) BR concentration: 5 µg ml⁻¹. b) Ascorbic acid concentration: 5 × 10⁻⁶ M. c) D-Saccharic acid 1,4-lactone concentration: 5 × 10⁻⁵ M. * BCA method,⁷⁾ ** HPLC method,⁸⁾ *** HPLC method.⁹⁾

3. 結果と考察

尿中 BR は、そのほとんどが比較的水溶性の高い抱合型ビリルビンとして存在していると報告されている。⁵⁾そこで、尿中 BR の分離法としての本抽出法の有用性を明らかにするため、まず水溶液中からの BR の抽出実験を行ったところ、界面活性剤相への BR の抽出率は 62.3 ± 0.7% (mean ± S.E.) となり、この値は BR 濃度や尿中に存在するタンパク質等の共存物質の濃度に依らず一定であった。抱合型ビリルビンは水溶性物質とされているが、疎水性の高いビリルビン部位を有しており、このため界面活性剤相に取り込まれるものと考えられる。Table 1 に BR とともに、種々の生体成分の界面活性剤相への抽出率を示す。BR のジアゾ化反応に影響を及ぼす尿タンパク質、アスコルビン酸、糖酸などの水溶性物質は界面活性剤相にはほとんど抽出されなかった。

界面活性剤相にビリルビン BII-テストワコー試薬を加えて呈色反応を行った際に得られた吸収スペクトルは水中におけるものとほぼ同じであり、界面活性剤相中の OTG はアゾ色素の生成反応やそのスペクトル特性に影響を及ぼさなかった。BR を測定に影響を及ぼす共存物質から分離し、界面活性剤相に濃縮することによって、尿中 BR のしきい値である 1 µg/ml 以下でも高感度に定量することができ、BR の検出限界は 0.05 µg/ml となった。Fig. 1 に本法による抽出を経た後に発色反応を行わせて得られた検量線を尿中 BR をそのまま測定したときの検量線と比較して示す。OTG 及び PEG 水溶液を加えたことによる試料体積増加と界面活性剤相への濃縮の結果、正味の濃縮率は 15.3 倍となった。界面活性剤相はやや粘濁であるものの、ピペットで採取し、96 穴マイクロプレート穴中に入れ、そこに呈色試薬を加えて混和・反応させるための支障にはならなかった。相分離抽出法と呈色反応後にマイクロプ

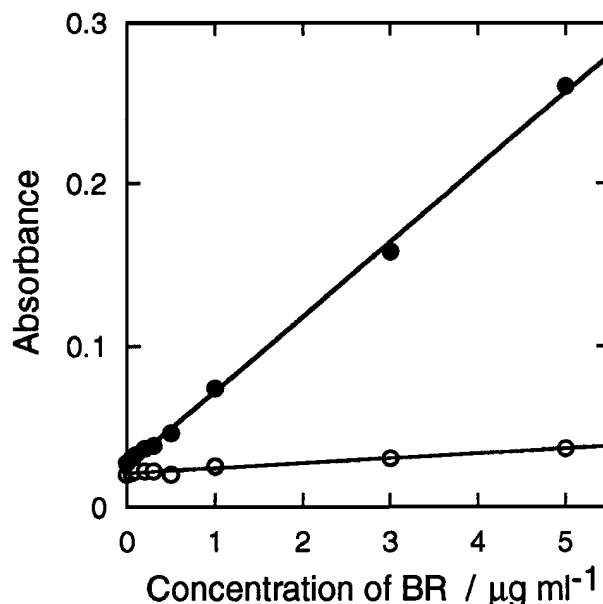


Fig. 1. Calibration Curves of BR

(●) With concentration: $y = 0.046x + 0.026$; $r^2 = 0.999$; $n = 2$, (○) without concentration: $y = 0.003x + 0.021$; $r^2 = 0.963$; $n = 2$.

レートリーダーを用いて吸光度測定を行う本法は、煩雑な操作や大がかりな装置を必要としないことから、尿中 BR の簡易・迅速な高感度定量法として有効と考えられる。

REFERENCES

- Ikoma J., Tsubouchi M., Adachi Y., "Nippon Rinsho 57 (Zokan: Kohan-i Ketsueki Nyo Kagaku Kensa (1))," 1999, p. 100.
- Kanai M., "Rinsho Kensaho Teiyo," Kanehara Shuppan, 1998, p. 166.
- Fevry J., Blanckaert N., Leroy P., Michiels R., Heirwegh K. P., *Hepatology.*, **3**, 177-183 (1983).
- Saitoh T., Matsudo T., Matsubara C., *J. Chromatogr. A.*, **879**, 121-128 (2000).
- Kitamura M., "Zissen Rinsho Igaku," Ishiyaku Shuppan, 1978, p. 277.
- Brown R. E., Jarvis K. L., Hyland K. J., *Anal. Biochem.*, **180**, 136-139 (1989).
- Sood S. P., Sartori L. E., Wittmer D. P., Haney W. G., *Anal. Chem.*, **48**, 796-798 (1976).
- Laakso E., Tokola R. A., Hirvisalo E., *J. Chromatogr.*, **278**, 406-411 (1983).