

文 献

- 1) M. Schöneshöfer, A. Fenner, G. Altinok, H. J. Duke : *Clin. Chim. Acta*, **106**, 63 (1980).
- 2) J. Nakamura, M. Yakata : *Clin. Chem.*, **29**, 847 (1983).
- 3) T. Seki, Y. Yamaguchi : *J. Liq. Chromatogr.*, **6**, 1131 (1983).

☆

Fluorometric determination of free glucocorticoids in human urine by high performance liquid chromatography. Tokuichiro SEKI and Yoshihisa YAMAGUCHI (College of Bio-Medical Technology, Osaka University, 1-1, Machikaneyama-cho, Toyonaka-shi, Osaka, 560)

In order to determine human urinary cortisol by high performance liquid chromatography and fluorometry, prepurification of cortisol in human urine by an open column chromatography on Amberlite CG-50 was examined. A fraction containing cortisol and cortisone was obtained from human urine by adsorption on a column of Amberlite CG-50 in the presence of 35 % ammonium sulfate at pH 2.5 and elution with acidic aqueous ethanol. Ethyl acetate extract of the fraction was analyzed using ODS column (Finepak C₁₈) and polystyrene gel column (Shodex RS_{pak} DS-613). Both gave two peaks that had retention time corresponding to that of cortisol and cortisone respectively. The recovery of 1 µg of cortisol and cortisone added to a urine sample was 90 per cent with R. S. D. of 7.0 % (n=5) and 2 ng of cortisol and cortisone could be detected.

(Received February 22, 1984)

Keyword phrases

cortisol and cortisone in human urine; high performance liquid chromatography; fluorometric determination of cortisol and cortisone using glycinamide.

紫外吸光度検出イオンクロマトグラフィーによる野菜中の無機イオンの定量

早川 和一[Ⓐ], 蛭名 令子*,
松本美枝子**, 宮崎 元一*

(1984年2月20日受理)

1 緒 言

野菜の発育は、無機イオンの吸収と密接な関係があり、無機イオンの過剰、欠乏、あるいはバランス変化による代謝異常が知られている¹⁾。そこで、これらの代謝異常の機序を解明し、正常な発育を行わせるためには、野菜や土壤に含まれる無機イオンの存在量や挙動について十分な知見が必要であり、そのためには、まずこれらのイオンを正確かつ迅速に分析することが要請されている。

著者らは、既に、紫外吸収検出器を備えた普及型高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 装置と市販イオン交換カラムとの組み合わせで無機イオンの分析が可能²⁾、吸光度検出イオンクロマトグラフィーを報告し³⁾、更に無機陽イオン及び無機陰イオンの分離と検出を詳細に検討した⁴⁾。そこで、この方法を野菜の無機イオンの定量に適用するための分離条件を検討したところ、簡単な前処理を施すだけで、主な無機イオンが容易に分析できることが明らかになったので報告する。

2 実 験

2.1 野菜試料

本研究で使用した野菜は、著者の一人が所属する試験場で栽培したもの、及び市販品である。

2.2 試 薬

HPLC 溶離液の調製に用いた試薬は、すべて市販特級品である。又、陰、陽イオンの標準溶液は、それぞれ特級塩化ナトリウム、亜硝酸ナトリウム、硝酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、硫酸カリウム、硫酸マグネシウム及び塩化カルシウム (いずれも和光純薬工業又は半井化学製) を用いて調製した。

* 金沢大学薬学部衛生化学教室 : 920 石川県金沢市宝町 13-1

** 富山県農業試験場野菜花き試験場 : 939-13 富山県砺波市五郎丸 288

2.3 装置

陰イオン分析用 HPLC 装置は、協和精密製無脈流送液ポンプ KHP-010 と協和精密製波長可変紫外吸収検出器 KLC-200 を用いて構成した。陰イオン分離用カラムには、Du Pont 製 Zipax SAX をスラリー法で充てんしたステンレスカラム (50 cm×2.1 mm I. D.) を用いた。陽イオン分離用 HPLC 装置は、協和精密製無脈流送液ポンプ KHP-010 と応用分光機器製波長可変紫外吸収検出器 UVILOG-5IIIA を用いて構成した。陽イオン分離用カラムには、Du Pont 製 Zipax SCX をスラリー法で充てんしたステンレスカラム (25 cm×4.6 mm I. D.) を用いた。

2.4 実験操作

野菜 (5~20 g) をひょう量してテフロン製ホモジナイザーに採り、これに 5 倍量のイオン交換蒸留水を加えて処理した。処理液を沓紙 (東洋 No. 6) で沓過し、通過液の 1 ml を水で 10 倍希釈した。一方、通過液の 1 ml、次いで水 4 ml を注射筒を用いて 5 ml/min の流速で Waters 製 Sep-pak C₁₈ カートリッジに通し、この通過液を集めてイオン交換蒸留水で定容 (10 ml) とした。以上の試料溶液の 20 μ l をマイクロシリンジで HPLC 装置に注入した。

3 結果及び考察

3.1 HPLC 条件

予試験から、野菜に比較的多く含まれる無機イオンは陰イオンでは、塩化物イオン、亜硝酸イオン、硝酸イオン、硫酸イオン、陽イオンでは、ナトリウムイオン、アンモニウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオンであった。そこで、主としてこれらのイオンを分析するための条件を、既報告の条件²⁾を基にして検討した。本研究に用いた陰イオン及び陽イオンの標準溶液の分析クロマトグラムと条件を Fig. 1, Fig. 2 に示した。

3.2 野菜抽出溶液のクロマトグラム

検討したいずれの野菜も、沓紙で処理するだけで、陰イオンについては安定したベースラインのクロマトグラムを得ることができ、塩化物イオン、硝酸イオン、硫酸イオンの定量は可能であった。例として、ハクサイ抽出溶液のクロマトグラムを Fig. 3(A) に示した。これに対して、陽イオンについては、濃度の高いナトリウムイオンとカリウムイオンのピークは検出できるが、ベースラインの変動が著しく、定量は不可能であった。このように、野菜の陰イオンの定量は、妨害成分が少なく極めて容易であるが、分析カラムの保護のためには、適当な

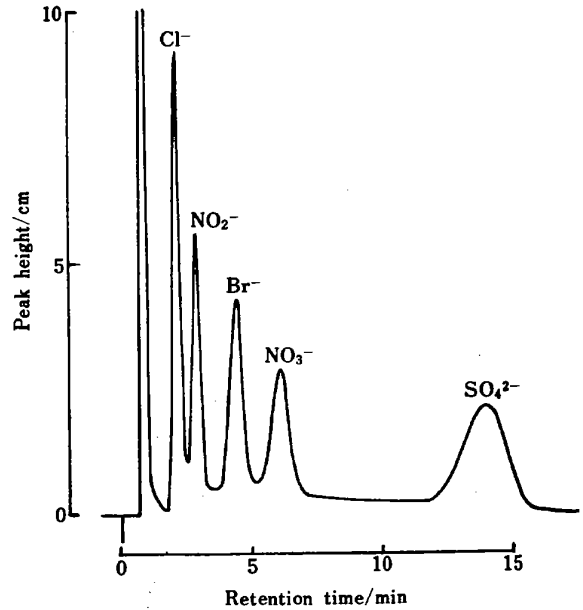


Fig. 1 Typical chromatogram of five inorganic anions

Column : Zipax SAX (50 cm×2.1 mm I. D.); Column temperature : Room temperature; Eluent : 5×10^{-4} M disodium phthalate; Flow rate : 1.0 ml/min; Detection : 240 nm (0.08 AUFS); Sample : 20 μ l of 1×10^{-4} M each ion

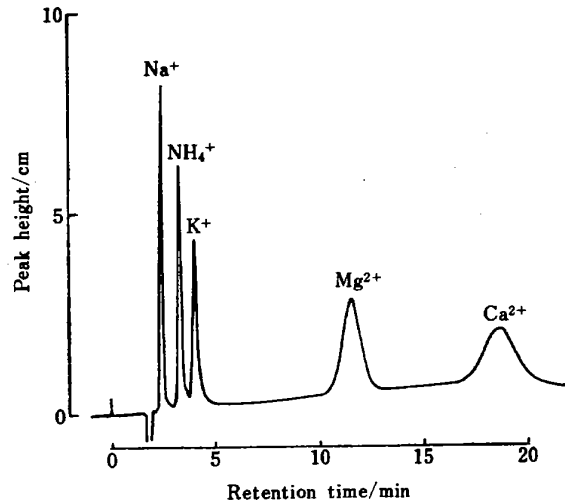


Fig. 2 Typical chromatogram of five inorganic cations

Column : Zipax SCX (25 cm×4.6 mm I. D.); Column temperature : Room temperature; Eluent : 2.5×10^{-3} M copper sulfate; Flow rate : 1.0 ml/min; Detection : 220 nm (0.08 AUFS); Sample : 20 μ l of 1×10^{-3} M each ion

前処理を施すことが望ましい。一例として、無機陰、陽イオンの回収に影響を及ぼしにくいと予想された Sep-pak C₁₈ 処理を施すと、いずれの野菜試料でも、陰イオンについては、Sep-pak C₁₈ 処理をしない場合とほぼ同

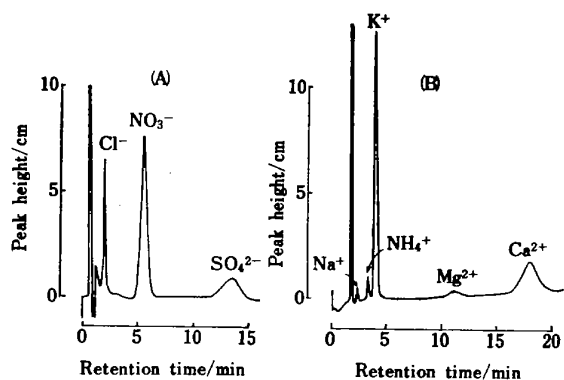


Fig. 3 Chromatograms of inorganic anions (A) and cations (B) in chinese cabbage juice

HPLC conditions of (A) and (B) were the same as described in Fig. 1 and Fig. 2, respectively.

様なクロマトグラムが得られ、定量が可能である。陽イオンについては、ハクサイ試料で定量可能なクロマトグラムが得られた {Fig. 3(B)}。しかし、外の野菜試料では、ベースラインの変動は軽減したが、定量分析には不十分であり、妨害成分を明らかにするとともに他の前処理法を検討する必要がある。又、ハクサイ処理液に塩化物イオン、硝酸イオン、及び硫酸イオンの標準溶液を添加して、Sep-pak C₁₈ 処理後の試料溶液を分析すると、いずれのイオンでも 96% 以上の良好な回収率が得られた。

3.3 野菜の無機陰イオン分析

試みに、数種の野菜汁中の無機陰イオンの定量を、Sep-pak C₁₈ 処理後の試料溶液について行い、その結果を、Table 1 にまとめた。いずれも、野菜汁中の濃度で表示したが、野菜の種類による無機陰イオン含量の差異が認められる。

Table 1 Determination of inorganic anions in vegetable juices

Vegetable juice	Concentration, ppm†		
	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
Chinese cabbage	125	930	230
Tomato	105	<10	50
Radish (green)	165	965	410
Radish (root)	540	1590	620

† Mean values of three samples

簡単な前処理を施せば、本法を用いて、野菜の無機イオン分析が可能であり、野菜の発育と無機イオンとの量的関係の検討に有効である。しかし、野菜抽出溶液の調

製法や前処理の方法などの違いにより、無機イオンの野菜からの回収率や組成に差が生ずることも考えられ、実際の定量分析では、これらの点を配慮する必要がある。

4 結 語

本法により、紫外吸収検出器を備えた普及型 HPLC 装置及び市販イオン交換カラムを用いて、無機イオンが分析できる。更に、簡単な前処理を施せば、本法で野菜の無機イオンが分析できる。

文 献

- 1) 池田英男, 大沢孝也: 園芸学雑誌, **49**, 563(1981).
- 2) 早川和一, 平木博美, 宮崎元一: 分化, **32**, 504(1983).
- 3) M. Miyazaki, K. Hayakawa, S. Choi: *J. Chromatogr.*, submitted.
- 4) K. Hayakawa, H. Hiraki, M. Miyazaki: in preparation.

☆

Determination of inorganic ions in some vegetables by ultraviolet photometric ion chromatography. Kazuichi HAYAKAWA, Reiko EBINA*, Mieko MATSUMOTO**, and Motoichi MIYAZAKI* (*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, 13-1, Takara-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa, 920; **Toyama Vegetable and Ornamental Crop Research Station, 288, Goromaru, Tonami-shi, Toyama, 939-13)

Determination of inorganic anions and cations in some vegetable juices was examined by ultraviolet photometric ion chromatography with a conventional HPLC system equipped with a UV monitor and a separating column packed with popular ion exchangers. Inorganic anions such as Cl⁻, NO₃⁻, and SO₄²⁻ in sample solution were completely separated on a Zipax SAX packed column (50 cm × 2.1 mm I. D.) with 5 × 10⁻⁴ M disodium phthalate as an eluent and detected at 240 nm. Inorganic cations such as Na⁺, NH₄⁺, K⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺ in sample solution were completely separated on a Zipax SCX packed column (25 cm × 4.6 mm I. D.) with 2.5 × 10⁻³ M copper sulfate as an eluent and detected at 220 nm. Under the conditions described above, the three anions in juices of chinese cabbage, tomato, and radish, and the five cations in Sep-pak C₁₈ treated juice of chinese cabbage were determined.

(Received February 20, 1984)

Keyword phrases

ultraviolet photometric ion chromatography; inorganic anions; inorganic cations; high performance liquid chromatography system using popular ion exchanger column; vegetable juice.