

原 著

尿中の Ethyl-β-D-glucuronide の定量法について

神 津 公

信州大学医学部法医学教室 (主任: 野田金次郎教授)

GAS CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF ETHYL-β-D-GLUCURONIDE IN HUMAN URINE

Tadashi KOZU

Department of Legal Medicine, Faculty of Medicine,
Shinshu University
(Director: Prof. K. NODA)

Key words: 尿中アルコール定量 (Quantitative Determination of Alcohol in Urine)
ガスクロマトグラフィー (Gas-chromatography)

まえがき

アルコールの生体内代謝については, Williams¹⁾によりつぎのように述べられている。

すなわち, 第一級アルコールは生体内で二つの反応を受けその大部分は脂肪酸への酸化であり, 他方わずかにグルクロン酸が形成される。このうち, main path については赤羽ら²⁾により, アルコールからアセトアルデヒドへの酸化, アセトアルデヒドから acetyl co A への転換, acetyl co A の代謝についてくわしく述べられている。また, minor path のうちグルクロン酸との抱合体については Kamil ら³⁾がウサギの尿中 ethyl-β-D-glucuronide (以下 Et-G と略記) を basic lead salt を用いて分離し, triacetyl-β-ethyl-D-glucuronide methyl ester として結晶化してとりだし, その代謝については, 投与後のアルコールが24時間以内にグルクロン酸と抱合し, その1%以上が Et-G として排泄されることを報告している。Jaakonmaki ら⁴⁾は, 溶媒抽出法とイオン交換法によりウサギおよびヒトの尿中から Et-G を抽出し,

methylester-trimethylsilylether (以下 Me-TMS と略記) 誘導体としてガスクロマトグラフ法により分析している。しかし, ガスクロマトグラフ法により尿中から Et-G を分離, 定量する方法についての報告は未だ見ていない。そこで, 今回, 尿中に排泄される Et-G を能率よく分離し定量する方法について検討を行なったので報告する。

実験方法

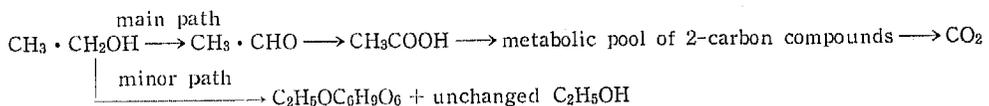
1. 試 薬

- | | |
|--------------------------|----|
| 1) Pyridine | 特級 |
| 2) Hexamethyldisilazane | 一級 |
| 3) Trimethylchlorosilane | 一級 |
| 4) Diazomethane-ether 溶液 | |

Nitrosomethylurea または Nitrosomethyl urethane およびエーテルに 40% KOH を徐々に滴下しながら蒸留して製す⁵⁾⁶⁾⁷⁾

- | |
|---------------------------|
| 5) Phenyl-α-D-galactoside |
| 6) Ethyl-β-D-glucuronide |

2. 分析試料



まず、24時間以前から飲酒していない正常人から採取した尿に Et-G を添加し、これを標準試料として測定し、回収率を求めた。さらに、飲酒者の尿中 Et-G の定量を行なった。

3. 尿中から Et-G の抽出法

尿 2~3ml を共栓つき 10ml 遠沈管にとり、pH を 7 に調整（アルカリ性の場合は、20% 酢酸溶液、酸性の場合は、10% アンモニア溶液）してから飽和塩基性

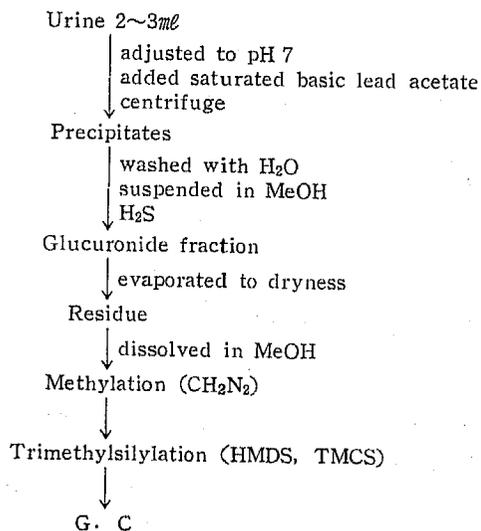


Fig. 1. Separation of ethyl-β-D-glucuronide from human urine

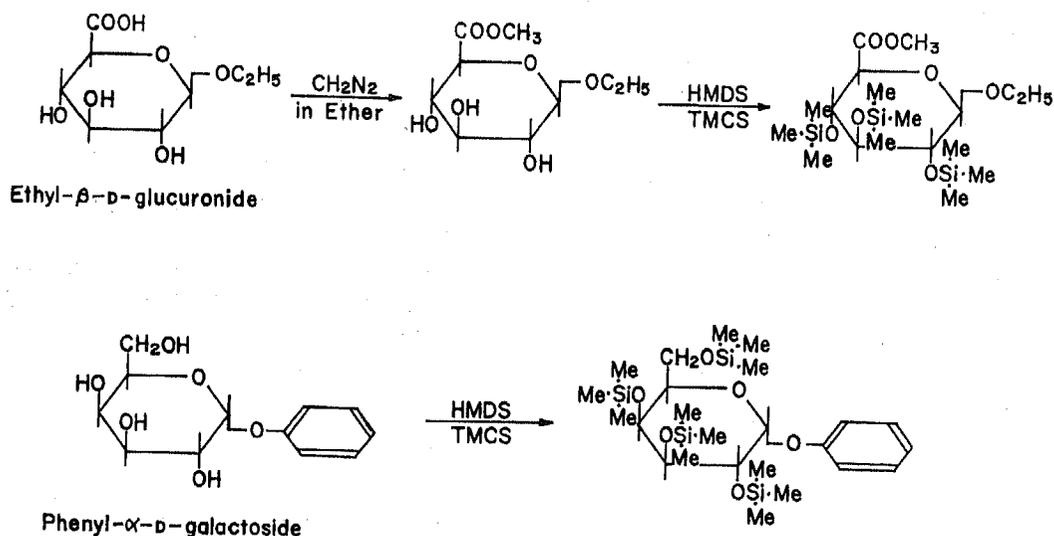


Fig. 2. Preparation of Me-TMS derivatives

酢酸鉛溶液を加えて沈澱を完結させ、遠心分離 (3000 r.p.m.) して上清を除去した。沈澱は水 5ml で洗滌後 5ml のメタノールにサスペンドさせ H₂S を十分に通じ生じた PbS を濾別し、PbS をメタノールで洗滌して洗滌液を濾液に合した後 evaporator を用いて乾固し、十分乾燥してからメタノールに溶解した (Fig. 1)。

4. ガスクロマトグラフィーのための Me-TMS 誘導体の製法

Et-G 抽出試料のメタノール溶液に diazomethane ether 溶液を加えて直ちに乾固した。これを pyridine 0.5ml に溶解し、hexamethyldisilazane 0.1ml と trimethylchlorosilane 0.05ml を加えて振り、しばらく放置してから約 70°C の水浴で加温して TMS 化した後⁸⁾⁹⁾乾固し、chloroform で抽出濾過し再び乾固して acetone 0.5ml に溶解して分析試料とした (Fig. 2)。

5. ガスクロマトグラフィーの測定条件

- 1) Apparatus : Shimadzu Gas Chromatograph GC-IB (dual column type) (H·F·I·D)
- 2) Column : N·G·S (neopentyl glycol succinate) 2% on chromosorb W (AW-DMCS) 60/80 mesh (Horning らの方法¹⁰⁾により coating) 4mmφ × 150 cm (stainless steel pipe)
- 3) Operating condition
 Column temperature : 160°C
 Injection port temperature : 210°C

尿中の Ethyl- β -D-glucuronide の定量法について

Detector temperature : 210°C

Carrier gas (N₂) : 60ml/min (Inlet press : 1.0 kg/cm²)

Hydrogen flow : 60ml/min

Air flow : 0.6l/min

Range : 0.8 volt

Sensitivity : 10³

Chart speed : 10mm/min

6. 定量法

Phenyl- α -D-galactoside (以下 Phe-Gal と略記) を内部標準物質として面積比により定量を行なった。内部標準物質は分析試料に塩基性酢酸鉛を加えて生成させた沈澱をメタノールにサスペンドする際に加えて以後同様な操作により処理を行なった。

7. 検量線作成のための標準液の調整

Et-G 10mg を 10ml のメタノールに溶解し、その 0.125ml, 0.250ml, 0.375ml, 0.500ml をフラスコにとり、そこへ Phe-Gal 10mg を 10ml のメタノールに溶解した溶液 1ml あて加えて Me ならびに TMS 化を行ないその 2 μ l をガスクロマトグラフに注入した (Fig. 3)。

8. 検量線の作成

標準物質 Phe-Gal (TSM) (重量 : μ g) と被検成分 Et-G (Me, TMS) (重量 : μ g) のピーク面積を測定し、横軸に Et-G と Phe-Gal の weight ratio をとり、縦軸に両者の peak area ratio をとり検量線を作成した。ピーク面積は半値幅法により計測した (Fig. 4)。

実験結果ならびに考察

1. Et-G の抽出法

Et-G の抽出方法としては、溶媒抽出法⁴⁾⁹⁾¹¹⁾, DEAE-Sephadex によるイオン交換法⁴⁾⁹⁾¹²⁾, 塩基性酢酸鉛による沈澱法³⁾¹³⁾が検討されている。このうち、溶媒抽出法は簡便ではあるが溶媒を大量に必要とするうえ数多くの妨害ピークが同時に抽出されるため Et-G を目的とする抽出方法としては不適当であった。

次に、DEAE-Sephadex による方法は今成、田村¹²⁾によりくわしく検討されている。この方法においては、まず DEAE-Sephadex の膨潤、活性化に時間を要するうえ、イオン交換能力が 0.6g に対し尿 1ml と限

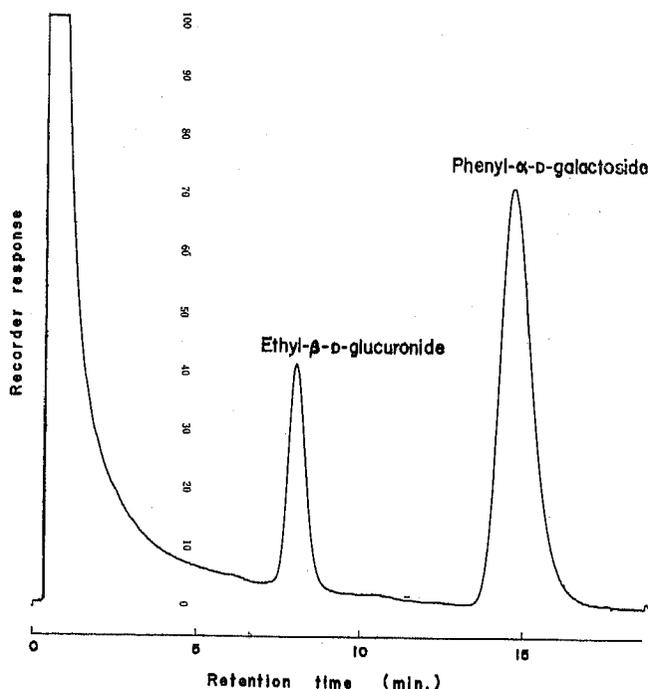


Fig. 3. Me-TMS ethyl- β -D-glucuronide (1.5 μ g) and TMS phenyl- α -D-galactoside (4 μ g)

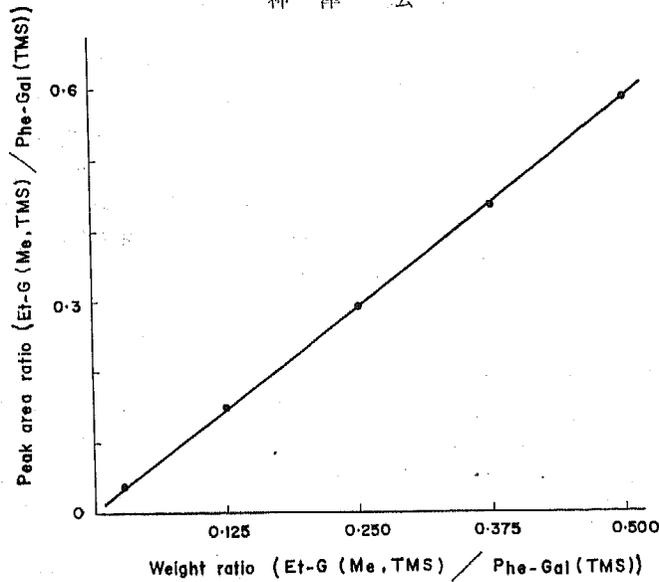


Fig. 4. Calibration curve of Ethyl- β -D-glucuronide

定されるうえ、カラムからEt-Gを溶出させるNH₄Clメタノール溶液が水のために発熱し気泡が生じ交換能力が低下すると思われた。そこで、メタノール溶液を冷蔵庫に保管しただちに使用するか10%の含水メタノール溶液を使用するなどの方法を試みたが十分な結果は得られなかった。そのうえ、全操作にかなりの時間を要した。

そこで、塚本ら¹³⁾による塩基性酢酸鉛での沈澱法を準用した。報告によると、まず尿試料を氷酢酸でpHを4に調整して飽和塩基性酢酸鉛溶液を加えて沈澱を生成させこれを濾過し、濾液をさらにNH₄OHでpHを8にし再び塩基性酢酸鉛により沈澱を生成させ、これをメタノールにサスペンドしてH₂Sを通じその濾液を用いている。本実験では、この方法の前の操作を除きpHを7に調整して飽和塩基性酢酸鉛で一挙に沈澱を生成させ、これをメタノールにサスペンドしH₂Sを通ずることにより、より簡単にglucuronide fractionを得ることができた。

2. ガスクロマトグラフィーの条件について

今回の実験においては、N・G・S (neopentyl glycol succinate) (1, 2, 5% on chromosorb w and gas chrom p), SE-52 (1.5, 2, 5% on chromosorb w), XF-1105 (2% on gas chrom p), OV-1 (2% on gas chrom p) の範囲で検討した結果、尿中の他成分との分離を考慮してN・G・Sが最も適当なカラムであることが認められた。

カラム温度については、140, 150, 160, 170, 180,

190, 200°Cの各温度で検討したところ、160°Cが適当であることが認められた (Fig. 5, 6)。

Glucuronideの分析に用いられている充てん剤の液相としては極性、無極性のものがともに用いられている。田村、今成¹⁴⁾はO-glucuronideの分析に1.5% SE-30, 1.5% SE-52, 2% QF-1, 1% CNSi, 1% N・G・Sを用いて良い結果を得ている。また、Jaakonmakiら¹⁵⁾はethyl- β -D-glucuronic acidの分析に10% F-60 (Dow-Corning fluid 560, a p-chlorophenylmethyl siloxane polymer) を、Dalglieshら¹⁶⁾は10% F-60と1% F-60を用いている。

3. Et-Gの添加回収試験

200 μ g, 500 μ g/2mlのEt-G添加尿試料各5例についての測定結果からその回収率を求めたところ、それぞれ、101.8%, 101.7%であった (Table 1)。

尿にEt-Gを添加した場合、内部標準物質を加えたglucuronide fractionをevaporatorで濃縮する際に水圧の変動への配慮と水浴の温度を30°C以下に保つことにより突沸などによる回収率の変動を防止することができることを知った。

4. 生体試料への応用

午後6時40分ころから午後10時ころまでに約1ダースのビールを飲み午後10時30分ころ自動二輪車を運転し停車中の普通乗用車に追突した酩酊事故者の尿を午後11時40分ころ (飲みはじめてから約5時間後) 採取した試料3mlについて分析を行なったところ尿1mlから48.2 μ gのEt-Gが検出された。なお、この尿試料

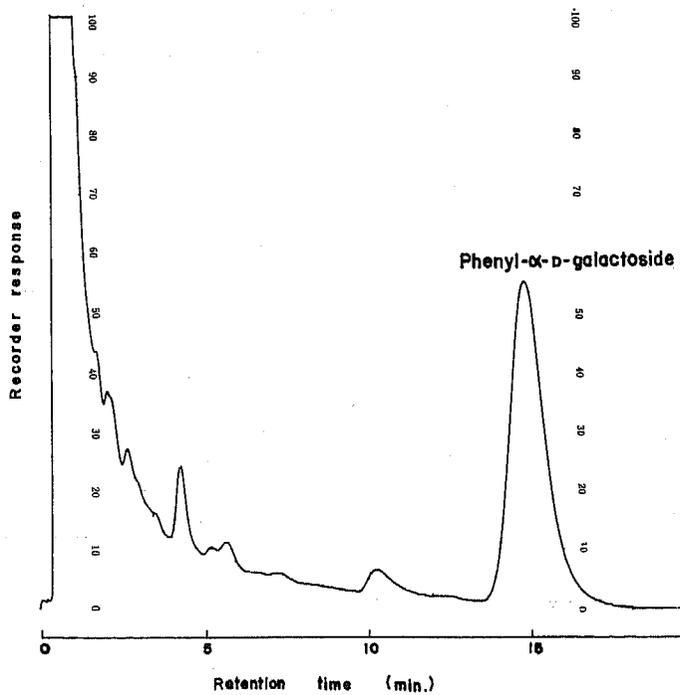


Fig. 5. Control (Human urine)

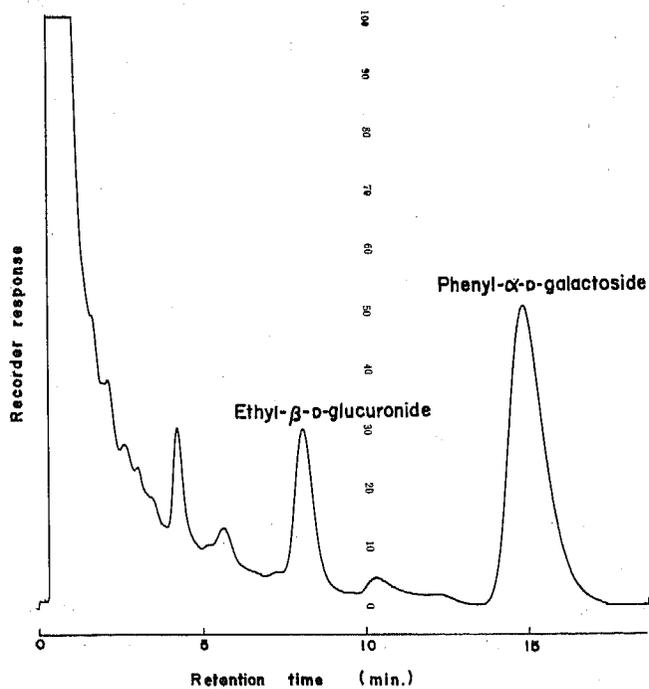


Fig. 6. Added Ethyl- β -D-glucuronide (200 μ g) (Human urine)

Table 1. Recovery of ethyl- β -D-glucuronide in human urine

No.	Added Et-G (μ g)	Recovered Et-G (μ g)	Recovery (%)
1	200	172.4	86.2
2	"	206.9	103.5
3	"	215.5	107.8
4	"	224.1	112.5
5	"	198.3	99.2
Ave		203.4	101.8
1	500	448.3	89.7
2	"	500.0	100.0
3	"	551.7	110.4
4	"	525.9	105.2
5	"	517.2	103.4
Ave		508.6	101.7

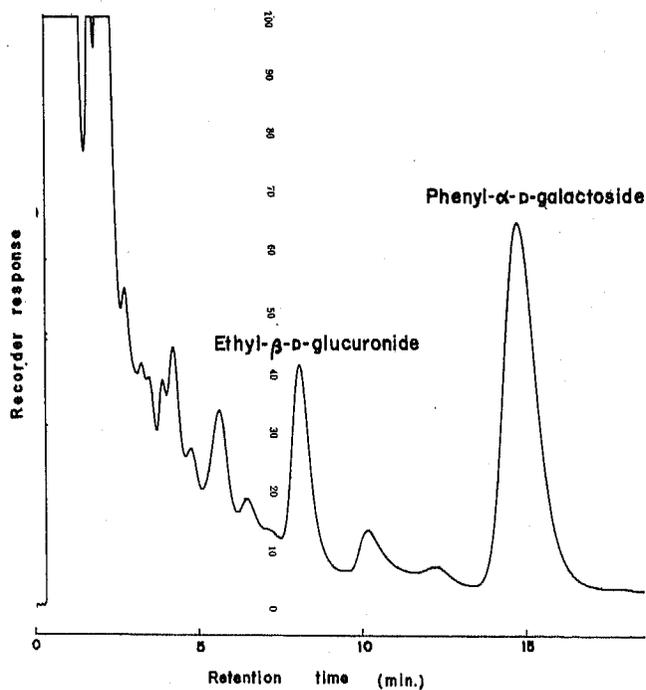


Fig. 7. Ethyl- β -D-glucuronide in the urine of drinker

を重クロム酸化法により測定したアルコール量は
2.70mg/mlであった (Fig. 7)。

この事例についての定量結果では、尿中に排泄され
た Et-G はアルコールに換算して0.37%がグルクロ
ン酸抱合して排泄されたことを知った。

結 論

以上により次の如く結論された。

1. 生体試料からの ethyl- β -D-glucuronide の抽出は
飽和塩基性酢酸鉛による沈澱法が迅速であり、他成

分の影響なく、分離が可能であった。

2. カラム充てん剤の液相は neopentyl glycol succinate (2%) により満足すべき結果が得られた。
3. 尿に ethyl- β -D-glucuronide を添加した場合の回収率は 200 μ g/2ml 添加で 101.8%, 500 μ g/2ml 添加で 101.7% の成績が得られる。
4. 酪酐運転による事故者の尿中からアルコール 2.70 mg/ml および ethyl- β -D-glucuronide 48.2 μ g/ml が検出された。

稿を終るにあたり、御指導御校閲をいただいた野田金次郎教授に、また、本研究に際し終始御指導をいただいた東京大学薬学部田村善藏教授ならびに今成登志男博士に深く感謝いたします。

標品の ethyl- β -D-glucuronide ならびに phenyl- α -D-galactoside は田村教授より御恵与いただいた。ここに併せ感謝いたします。

文 献

- 1) Williams, R. T.: Detoxication mechanisms, Second Edition, 46-49, 52-55, Chapman & Hall Ltd, London, 1959.
- 2) 赤羽治郎, 伊古美文雄: アルコール中毒の生化学. 代謝, 4: 20-25, 1967.
- 3) Kamil, I. A., Smith, J. N. and Williams, R. T.: The isolation of methyl and ethyl glucuronides from the urine of rabbits receiving methanol and ethanol. Biochem. J., 54: 390-392, 1953.
- 4) Jaakonmaki, P. I., Knox, K. L., Horning, E. C. and Horning, M. G.: The characterization by gas-liquid chromatography of ethyl- β -D-glucosiduronic acid as a metabolite of ethanol in rat and man. Europ. J. Pharmacol., 1: 63-70, 1967.
- 5) 百瀬 勉: 有機定性分析, 122-123, 広川書店, 昭和26.
- 6) 富道悦男, 中沢浩一: 有機合成化学, 353-355, 広川書店, 昭和26.
- 7) 山口誠太郎: 実験有機化学, 362-363, 南江堂, 昭和27.
- 8) Sweely, C. C., Bentley, R., Makita, M. and Wells, W. W.: Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. J. Amer. chem. Soc., 85: 2497-2507, 1963.
- 9) Dalglish, C. E., Horning, E. C., Horning, M. G., Knox, K. L. and Yarger, K.: A gas-liquid-chromatographic procedure for separating a wide range of metabolites occurring in urine or tissue extracts. Biochem. J., 101: 792-810, 1966.
- 10) Horning, E. C., Vanden Heuvel, W. J. A. and Creech, B. G.: Separation and determination of steroids by gas chromatography. Meth. biochem. Anal., 11: 69-147, Interscience Publisher, New York, 1963.
- 11) 島津科学器械ニュース: International symposium on biochemical applications of gas chromatography. 9: 9-10, 1967.
- 12) Imanari, T. and Tamura, Z.: Gas chromatography of glucuronides. Chem. pharm. Bull., 15: 1677-1681, 1967.
- 13) Tsukamoto, H. and Terada, S.: Metabolism of drugs (XXXIII). Metabolic fate of p-hydroxybenzoic acid and its derivatives in rabbit (1). Chem. pharm. Bull., 8: 1066-1070, 1960.
- 14) Tamura, Z. and Imanari, T.: Gas chromatography of o-glucuronides. Chem. pharm. Bull., 12: 1386-1388, 1964.

(1973. 12. 10 受稿)