

## ガスクロマトグラフ法による尿中 中性ステロイド分析法

川崎医科大学 生化学

日高和夫, 井内岩夫

吉田克子

川崎医科大学 内分泌内科

天工厚子

(昭和51年4月30日受付)

### Improved Method of Urinary Steroid Analysis by Gas Chromatography

Kazuo Hidaka, Iwao Iuchi

and Katsuko Yoshida

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical school

Atsuko Tenku

Division of Endocrinology, Department of Internal Medicine  
Kawasaki Medical School

(Accepted on Apr. 30, 1976)

尿中中性ステロイドのガスクロマト(GC)法による定量分析を日常検査法として実用化するために測定法の改良と装置に工夫をこらした。ステロイド抽出物の脱水に無水硫酸ソーダのかわりにジメトキシプロパンを使用し、またステロイドのシリル化のために抽出溶媒を迅速にしかも完全に除去するために湿式の温水浴のかわりに乾式の温風浴を用いた。本法では、1) 各ステロイドの検量線は感度は異なるがいずれも直線となり、再現性も良好で、尿にアンドロステロン(An)、エチオコラノロン(Et)、プレグナンジオール(Pd)、プレグナントリオール(Pt)、テトラヒドロコチゾン(THE)、テトラヒドロコチゾール(THF)およびコルトロンの各100 $\mu$ gの添加時の回収率はそれぞれ100.1, 92.5, 98.2, 85.5, 82.6, 81.3および91.3%であった。2) 正常人の24時間蓄尿13例において、An/EtおよびPd/Ptの濃度比は男性ではそれぞれ1.0~1.5, 1.0以下であり、女性では1.0以下と1.4~2.7であった。また、両性ともTHE/THF比は1.0~2.5であった。以上の成績から操作の簡便化と分析時間の短縮をはかった本法が従来法と同様の成績を収めうることがわかり推奨に値することを知った。

In order to improve the ordinal way of gas chromatographic determination of urinary steroids into more simple and practical use, several modifications of

the procedures and apparatus were contrived. Dimethoxypropane instead of anhydrous sodium sulfate was successfully used for removal of water from the solvent of urinary extract and special device of air bath was conveniently served for quick evaporation of extracting solvent and drying up of it prior to silanization process.

Calibration curve of the steroid had different sensitivity, but straight and proportional to its absolute amount. The individual recovery after addition of 100  $\mu\text{g}$  of androsterone, etiocholanolone, pregnanediol, pregnanetriol, tetrahydrocortisone, tetrahydrocortisol and cortolone into urine was 101.1, 92.5, 98.2, 85.5, 82.6, 81.3 and 91.3 per cent, respectively. The An/Et ratios in the normal adult male were within 1.0–1.5, while those of the normal adult female were below 1.0. The Pd/Pt ratios in male and female were also revealed the discrepancy indicating below 1.0 and 1.4–2.7, respectively.

The THE/THF ratios seemed no difference in both sexes having the value of 1.0–2.5.

## はじめに

ステロイドホルモンのガスクロマト (GC) 法による分析は1960年 Horning らがその第一報を報告して以来、本法が従来の比色定量でうかがい得ない個々のホルモンに関する重要な知見を与えることがあきらかになり、多数の報告がなされる様になった<sup>1)2)3)4)</sup>。しかしながら、尿採取から GC 分析までの前処理には多くの煩雑な操作を必要とし、その所要時間も長く、常に再現性あるデータを得ることがむづかしかった。さらにそれをルーチン化するというにいたっては多くの難問題を残し現在のところ研究室レベルの検査法といえる。そこで私共はこの前処理の操作を吟味し、方法を簡略化するための装置等を工夫し精度をそこなわず、容易に測定しうるように改良したのでそれを臨床例の検査成績とともにここに報告したい。

## 測定法

試薬：測定に用いる以下の試薬は特級品、もしくはそれを更に蒸留法等により精製して用いた。即ち、 $\beta$ -グルクロニダーゼ (東京臓器)、ペニシリンG カリウム、0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0)、2 N-NaOH、飽和食塩水、ジメトキシ

ロパン、ピリジン、酢酸エチル、メトキシアミン塩酸塩、ビストリメチルシリルアセトアミド (BSA)、トリメチルシリルイミダゾール (TMSI)、内部標準物質 (n-テトラコサン (n-C<sub>24</sub>) とコレステロールブチレート (ChB) をそれぞれ 500  $\mu\text{g}$ 、1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  酢酸エチル溶液をこしらえて使用する) 等である。

装置：i) 抽出洗滌装置：分液漏斗は図 1a に示す如き工夫をほどこして使用した。ii) 乾式温風浴：不燃性アスベスト板を用いて図 1b に示す装置をこしらえ使用した。この装置には温風浴温度を一定にするための温度調節器およびファンが組込んである。iii) ガスクロマトグラフ装置：島津 GC-5 A、FID 検出器を用いた。分析条件は次の通りである。ガラスカラム、4 mm  $\times$  3 m；充填剤、1.5% OV-1；キャリアーガス、N<sub>2</sub>, 60 ml/min；H<sub>2</sub>, 40 ml/min；エア-、0.9 l/min；カラム温度、180–300°C、昇温速度、1°C/min。

## 測定操作

I) 採尿：あらかじめ 25% 硫酸 10 ml を加えた容器に 24 時間尿を蓄尿し、全容量を測定した後、その一部を綿栓濾過し、50 ml を被検尿とする (蓄尿量が 1 l 以下の場合は綿栓濾過後、

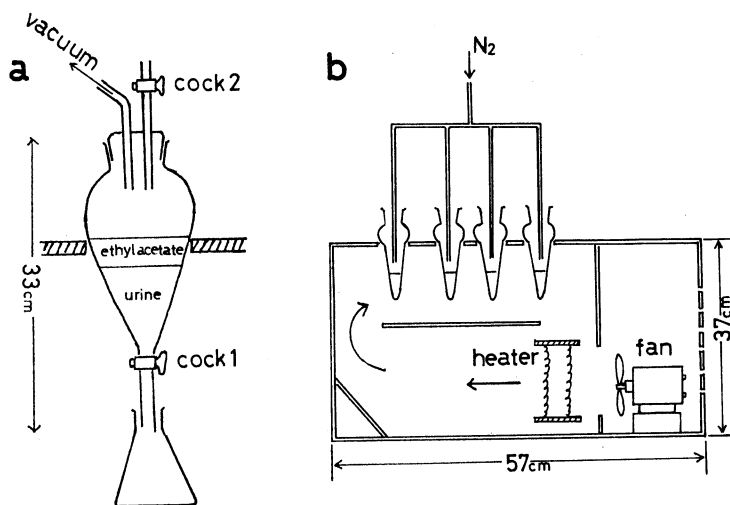


Fig. 1. Schematic view of an apparatus for extraction and washing (a) and an airbath with nitrogen blowing (b).

全容量の1/20量を取り，水を加えて50 ml とし被検尿とする).

II) 加水分解：pH 試験紙を用いて被検尿のpHを25%硫酸もしくは20% NaOHを用いて5.0に調整する. 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 10 ml,  $\beta$ -グルクロニダーゼ 15000 単位 (尿 1 ml につき 300 単位), 防腐剤としてペニシリン G カリウム 10 万単位を加えて 37°C で 48 時間加水分解する.

III) 抽出および洗浄：抽出洗浄装置に水解尿を移し入れ，30 ml の酢酸エチルで抽出し，さらに同量の酢酸エチルで 2 回計 3 回抽出を行なう. 一緒にした酢酸エチル抽出液を 10 ml の 2N-NaOH で 3 回洗浄して尿色素およびエストロゲン分画を除く. 次いで 15 ml の飽和食塩水で 2 回洗浄する. 洗浄した抽出液に 2 ml のジメトキシプロパンを加えてよく振盪し，水分を充分に分解除去した後，ロータリーエバポレーターを用いて酢酸エチルを減圧留去する. 得られたステロイド乾固物を少量の酢酸エチルに溶解し，その全量をあらかじめ内部標準物質 0.1 ml を添加している特殊遠心管に移しかえる. 60°C に設定した乾式温風浴内でこの遠心管の酢酸エチルを N<sub>2</sub> ガスを吹きつけて完全に除去する. これに 7~10 mg のメトキシアミン塩酸塩と 0.5 ml のピリジンを加え密栓し室温

で一晩反応させメトキシム化反応 (MO 化) を進行させる. 次いで温風浴内で N<sub>2</sub> ガスを吹きつけピリジンを除去し，その乾固物に BSA および TMSI を 0.1 ml ずつ加え，ガラス栓をし，さらにテフロンシールで密封し，150°C で 5 時間加熱し，シリル化反応 (TMSI 化) を完全に進行させる. GC 分析にはその 1~2  $\mu$ l を用いる.

## 成 績

尿中中性ステロイドの同定は内部標準物質とし加えた n-C<sub>24</sub> がまず最初に検出され，ChB が目的ステロイドが出しまった最後に検出されるから，n-C<sub>24</sub> および ChB に対する各ステロイドの相対保持時間 (RRT) を調べるにより容易になしえた. 尿に各種ステロイド純品を絶対量として 50, 100, 150 および 200  $\mu$ g 添加し，抽出から TMSI 化までの全操作を指定した操作通りに行ない，ChB (100  $\mu$ g) に対する各ステロイドホルモンの面積化を縦軸に，添加量を横軸にとると各ステロイドホルモンは感度は異なるが原点を通る直線となり定量性があることがわかった. (図 2) また尿にアンドロステロン (An)，エチオコラノロン (Et)，プレグナンジオール (Pd)，プレグナントリオール (Pt)，テトラヒドロコーチゾン (THE)，テトラヒドロコーチゾール (THF) およびコルトロンの 100  $\mu$ g を添加し全操作を通じての回収率はそれぞれ 101.1, 92.5, 98.2, 85.5, 82.6, 81.3 および 91.3% であった. また同一条件で全操作を 4 回くり返した場合の再現精度でも良好であった. また酢酸エチル抽出液中の水分除去にジメトキシプロパンを使用した，これは従来法の無水硫酸ソーダと比べ脱水能力に差異はなかった. 正常男性および女性の尿中中性ステロイド排泄パターンの各 1 例をそれぞれ図 3 の a および b に示した. 溶出順序

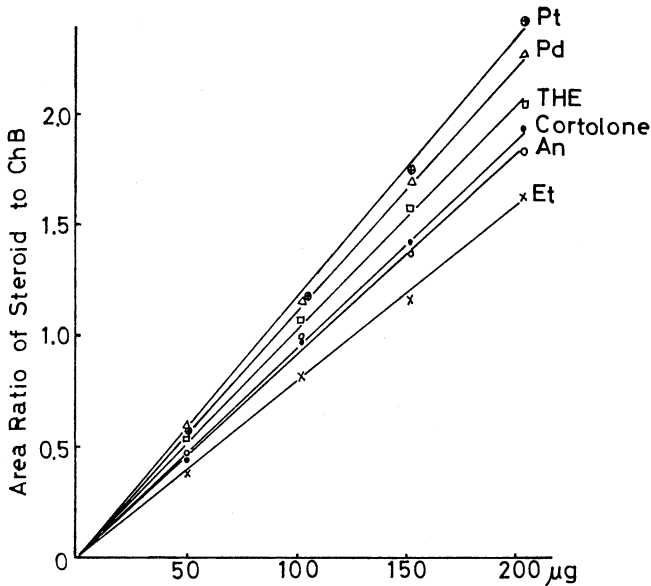


Fig. 2. Calibration curves of TMS-derivatives of individual steroid; An, Et, Pd, Pt and THE correspond to androsterone, etiocholanolone, pregnanediol, pregnanetriol and tetrahydrocortisone, respectively.

は最初に標準物の n-C<sub>24</sub>, 次いでアンドロゲン代謝系の An, Et が出現し, 続いてプレグナン代謝系の Pd, Pt, THE, THF, cortolone, cortol, そして最後に ChB (図3ではSTDと記入) が現われた。定量した正常人の尿中中性ステロイド排泄量を図4に示した。一般に男性では An>Et, Pt>Pd, 女性では Et>An, Pd>Pt の傾向があるが, 17-OHCS 分画においては男女差は認められず, とともに THE>THF の傾向を示した。そして男性では An/Et = 1.0~1.5, Pd/Pt < 1.0, 女性では An/Et < 1.0, Pd/Pt = 1.4~2.7 であった。また正常人において THE/THF = 1.0~2.5 であった。本法による病的例の分析として

は副腎過形成による Cushing's Syndrome<sup>5)</sup> 患者 (♂, 39歳) の尿中ステロイド排泄パターンを図5aに示した。17-OHCS 分画の著明な増大がみられ, 特に THF は高値を示していたが, これは cortisol の cortisone への11位水酸化抑制のためと判断された。図5bは Adrenogenital Syndrome<sup>6)</sup> 患者 (♀, 21歳) の尿中中性ステロイドの分析例で, 正常人尿と異なり Pregnane 系ステロイドの Pt, Pregnanetriolone などのピークが著しく増大し, An>Et, Pt>Pd という臨床像に符合して男性化像を示していた。しかし cortisol, cortisone の代謝排泄ステロイドの THE, THF など認められることから, 部分的 C<sub>21</sub>-hydroxylase 欠損によるものと考えられた。図5cは甲状腺機能亢進症患者 (♂, 39歳) の尿中ステロイドの成績である。特に THE および cortolone のピークの増大が著明であったのは cortisol から cortisone への転換促進のせいと理解された。

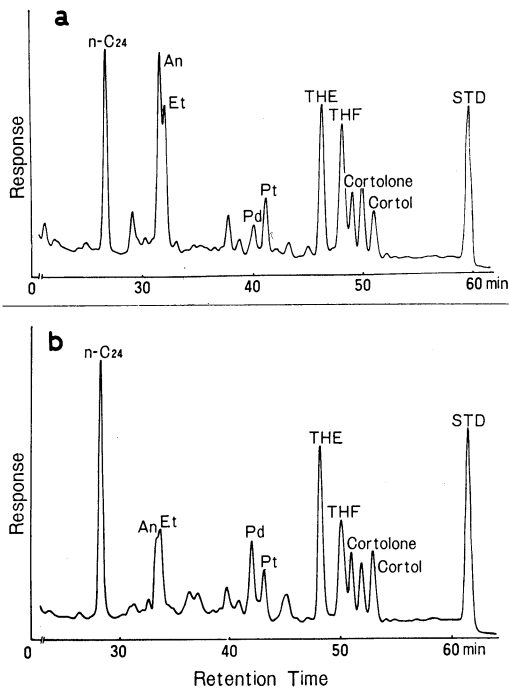


Fig. 3. Gas chromatogram of urinary steroid of normal adult subjects; a) male, 28 y, b) female, 21 y.

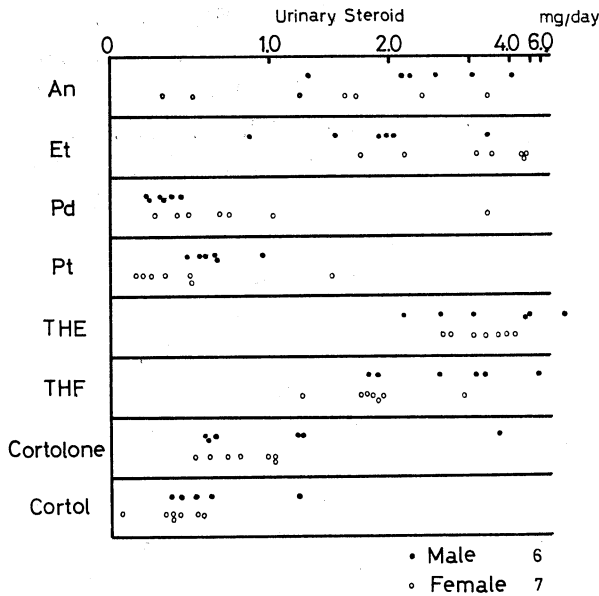


Fig. 4. Normal values of urinary steroid.

考 按

以上の如く、ステロイドホルモンのGC分析はホルモン産生臓器の機能を知るうえで欠かす事が出来ない手段であるが、定量性を失うことなくこれを日常検査に取入れるための操作の簡略化、能率化をはかったが、これには特に装置の工夫が大切であった。まず抽出洗浄装置として図1aの如き装置を工夫したが、これは酵素水解尿(50 ml)を図の分液漏斗(容量200 ml)に入れ、酢酸エチル30 mlを加え、コック1およびコック2を閉じた状態でアスピレーターを働かせ容器内を陰圧にし、コック1を開いて尿と酢酸エチルを一定時間混合攪拌させる。コック1を閉じコック2を開いて常圧にもどし二層を分離させた後、尿と酢酸エチルを別々の受器にとる。尿を再び分液漏斗にもどし、酢酸エチルを新たに加え、抽出をくり返す。次に酢酸エチル全抽出液を分液漏斗にもどし、2N-NaOH 10 mlを加え抽出の場合と同様な操作で洗浄を行なう。飽和食塩水による洗浄も同様な操作で行なえるようにしたものである。この装置を希望の数だけセットすればステロイドホルモンの損失もなく同一条件下で多数の尿の抽出および

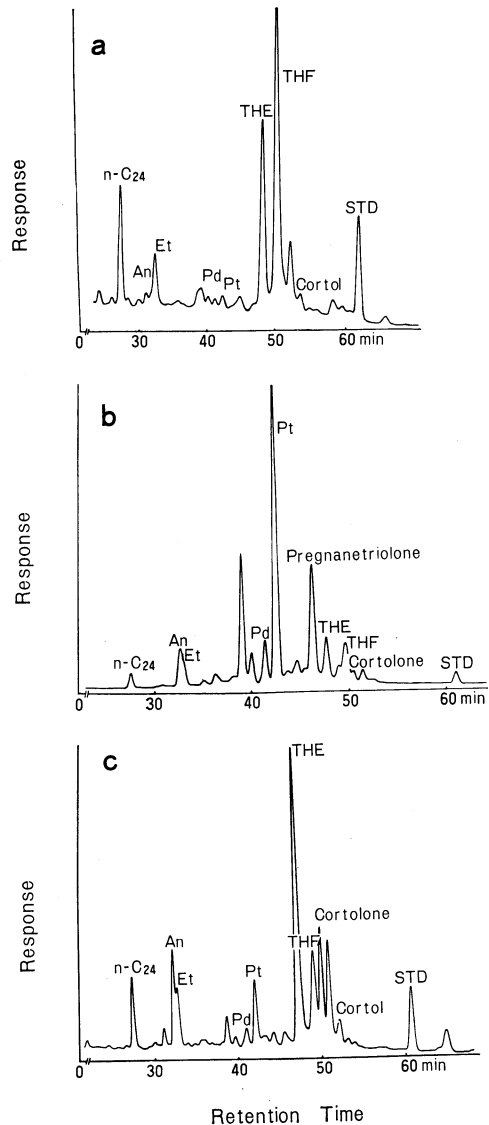


Fig. 5. Gas chromatogram of urinary steroid in patient with endocrine disease; a) Cushing's Syndrome, b) Adrenogenital Syndrome, c) Hyperthyroidism.

洗浄が行なえる利点がある。また乾式温風浴も考案したが、これは抽出乾固物を酢酸エチルに溶解したのち、特殊遠心管に移し、60°Cに設定した図1bの温風浴内でN<sub>2</sub>ガスを吹きつけ、迅速に酢酸エチルを完全に除去するためである。同様にMO化後のピリジンを迅速に水分を混入させることなく除去しうる。特に温風

浴は水浴と異なり、湿気を気づかう心配がなく、しかも設定温度への温度上昇が迅速で、調節も非常に容易であった。

ステロイドの同定には普通 methylene unit value (MU 値)<sup>7)</sup> か、1種類の内部標準による相対保持時間 (RRT 値) 法<sup>9)</sup> が用いられているが、私共は2種類の内部標準を用い、両者の間に現われる各ステロイドの RRT 値から容易に同定を行なえるようにした。特に昇温法により低沸点から高沸点までのステロイドを1つのクロマトグラムで同定する場合、前半に検出されるステロイドに対しては n-C<sub>24</sub> で、後半のステロイドに対しては ChB で確認する方が正確である。無水硫酸ソーダとジメトキシプロパン<sup>9)</sup> の脱水能力には得られた成績から判定し、差は認められなかったが、ジメトキシプロパンを使用すると前者を使用した時おこる過剰操作の煩雑さを省略できた。TMSI 誘導体生成過

程において、この水分の排除が完全であるか否かが成分を異性化させて峯性にしない要点であり、定量分析をする場合に気をつける重要な点であるが、私共は抽出溶媒の除去および MO 化後のピリジン除去に乾燥 N<sub>2</sub> ガスを吹きつけると同時に温風浴を使用することによりこの問題を解決した。

尿中に排泄される中性ステロイドは副腎由来のものや卵巣および卵巣由来のものがある。これらのステロイドの大部分は肝においてグルクロン酸抱合体か硫酸抱合体となって尿中に排泄される。しかし 17KS 分画のデヒドロエピアンドロステロン (DHA) を除いて殆どの中性ステロイドはグルクロン酸抱合体が圧倒的であり<sup>10)</sup>、このことを念頭にして分析を進めれば、いくつかの症例に示した如く、グルクロンダーゼ水解による GC 分析だけでステロイド代謝の有様をよくうかがい知ることが出来る。

## 文 献

- 1) Sparagana, M., Keutmann, E. H. and Mason, W. B.: Quantitative determination of individual C<sub>19</sub>O<sub>2</sub> and C<sub>19</sub>O<sub>3</sub> urinary 17-Ketosteroids by gas chromatography, *Anal. Chem.*, 5: 1231—1238, 1963.
- 2) Gardiner, W. L. and Horning, E. C.: Gas-liquid chromatographic separation of C<sub>19</sub> and C<sub>21</sub> human urinary steroids by a new procedure, *Biochim. Biophys. Acta*, 115: 524—529, 1966.
- 3) Chambaz, E. M. and Horning, E. C.: Conversion of steroids to trimethylsilyl derivatives for gas phase analytical studies: reactions of silylating reagents, *Anal. Biochem.*, 30: 7—24, 1969.
- 4) Horning, E. C., Devaux, P. G., Moffat, A. C., Pfaffenberger, C. D., Sakauchi, N. and Horning, M. G.: Gas phase analytical separation techniques applicable to problems in clinical chemistry, *Clin. Chim. Acta*, 34: 135—144, 1971.
- 5) 本橋賢二, 大沢仲昭, 山路 徹, 谷岡達男, 井林 博: Cushing 症候群. *日本臨床*, 26: 3141—50, 1968.
- 6) Bongiovanni, A. M., Eberlein, W. R. and Moshang, T. Jr.: Urinary excretion of pregnanetriol and Δ<sup>5</sup>-pregnenetriol in two forms of congenital adrenal hyperplasia, *J. Clin. Invest.*, 50: 2751—2754, 1971.
- 7) 坂内昇, 林 明, 金井洋子: ステロイドホルモン定量法に関する最近の進歩 (その3完). *ガスクロマトグラフ法*, *日本臨床*, 29: 167—173, 1971.
- 8) 橋本浩三, 森 正彦, 高原三郎, 大藤 真: OV-210 を使用した gas liquid Chromatography による尿中中性ステロイド分析法の検討. *ホルモンと臨床*, 19: 915—921, 1971.
- 9) Hirano, K., Mori, K., Kawai, S. and Ohno, T.: Gas chromatography of urinary anthranilic acid, *J. Chromatogr.*, 64: 17—177, 1972.
- 10) Solomon, S. and Bhavnani, B.: The isolation and metabolism of conjugates of neutral steroids from natural sources, in *Chemical and Biological Aspects of Steroid Conjugation*, ed. by Bernstein, S. and Solomon, S., Springer-Verlag, New York, 1970, p. 321.