

ポストカラム誘導体化-蛍光検出HPLCによる尿中 δ -アミノレブリン酸の分析

尿中 δ -アミノレブリン酸(δ -ALA)の測定は鉛曝露労働者の健康管理指標として有用なものであるとされています。そのプレカラム蛍光誘導体化による測定はすでにテクニカルインフォメーションNo. 69で紹介致しました。ここでは同様の蛍光誘導体化法をポストカラム反応に適用した測定について検討した結果を報告致します。

測定条件を下に、装置システム構成図をFig. 1に示します。

まず、反応温度について検討致しました。反応温度を70~120℃とした場合の標準 δ -ALA 1mg/lのピーク面積の変化をFig. 2に示します。95~100℃において最大のピーク面積が得られることがわかり、以下の検討は反応温度は95℃にて行いました。

検量線については0.1~50mg/lの濃度範囲で直線性を有しており(Fig. 3)、検出限界はS/N=3で2.9 μ g/lとプレカラム法と比較して約3倍高感度でした。標準試料(1mg/l)、及び人尿の測定に適用した結果をFig. 4に示します。人尿について連続測定し再現性を調べたところ、n=10でピーク面積の相対標準偏差1.05%と良好でした。

測定条件

カラム	: TSK gel SCX (6.0mm ID×15cm)		
溶離液	: A液; 10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.0)		
	: B液; 10mMリン酸水素2ナトリウム + 50mM水酸化ナトリウム		
流速	: 1.0ml/min		
温度	: 40℃		
グラジエント	時間	A液	B液
	0~3min	100%	0%
	3~12min	80%	20%
	12~17min	0%	100%
	17~24min	100%	0%
	*ステップグラジエント、24minサイクル		
反応液	: C液; 2M酢酸水溶液中 18.5%ホルムアルデヒド		
	: D液; 水/エタノール/アセチルアセトン=1/1/2		
反応液流速	: C液; 0.1ml/min		
	: D液; 0.4ml/min		
反応温度	: 95℃		
注入量	: 10 μ l		
検出	: 蛍光検出 励起波長363nm 蛍光波長473nm		

試料の前処理 (除タンパク)

試料1mlに対し、10%トリクロロ酢酸0.5mlを添加、攪拌後、遠心分離(12000rpm、5分)し、上清を注入致しました。

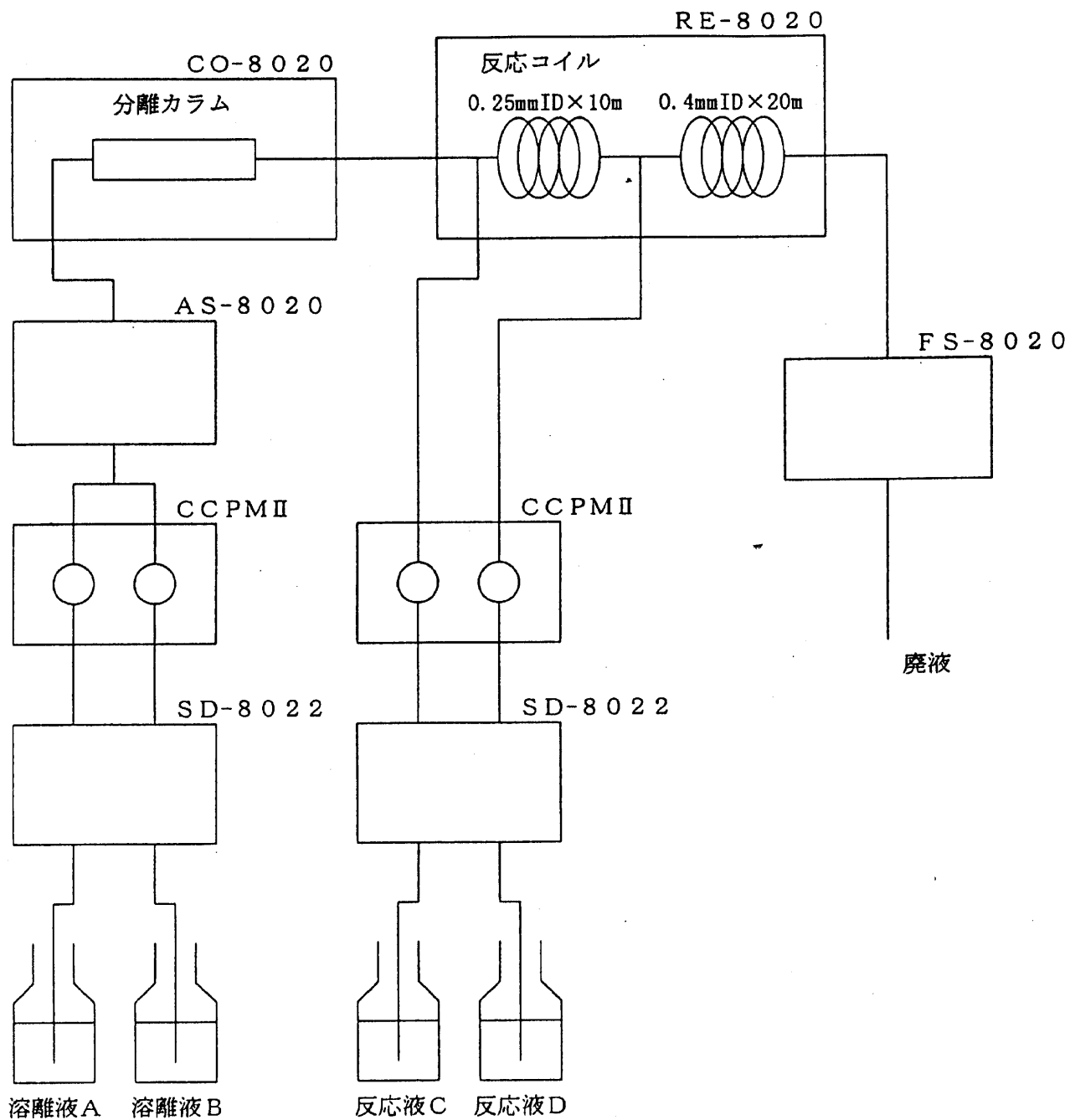


Fig. 1 装置構成図

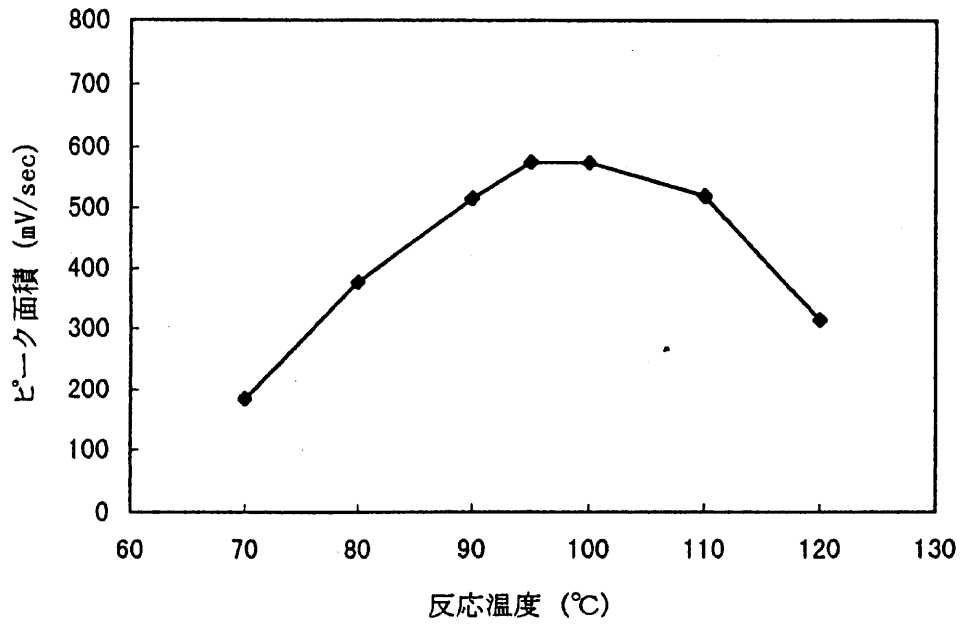


Fig. 2 ピーク面積に対する反応温度の影響

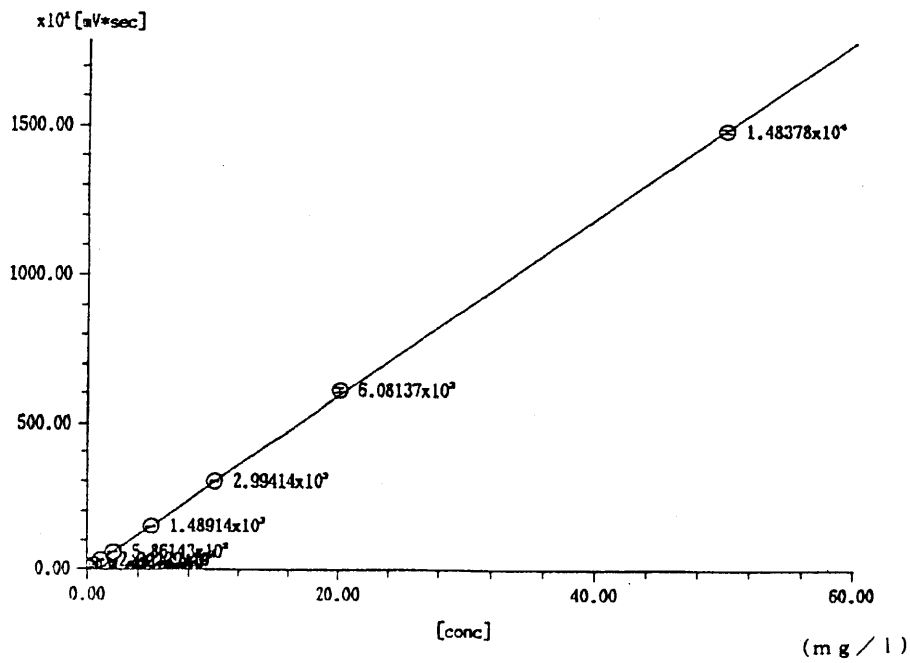
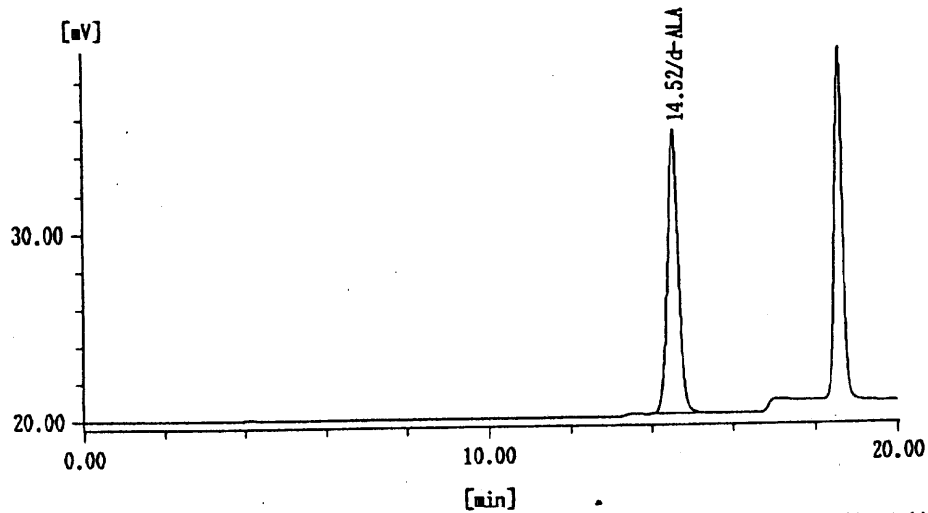


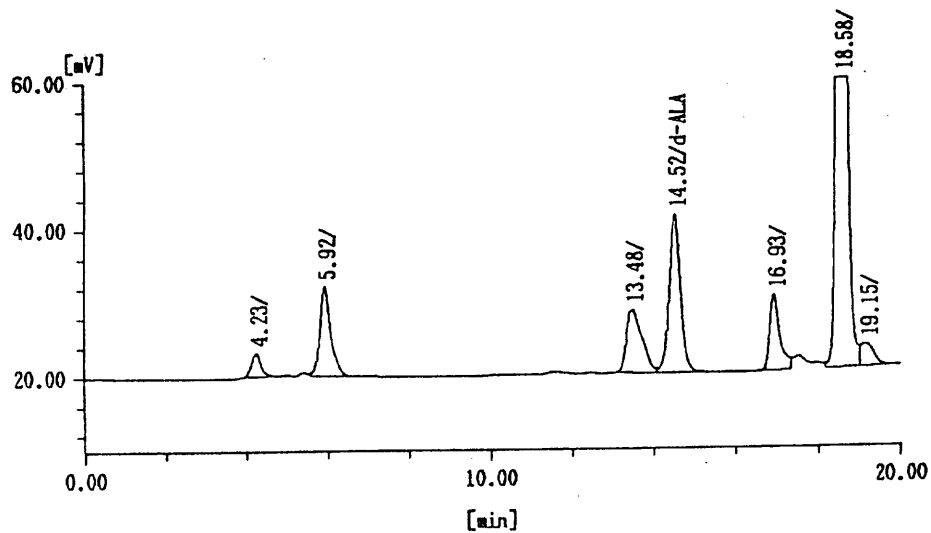
Fig. 3 検量線



Ch No. : データ解析 Ch. 1 計算方法 : 絶対検量線法
 カップ番号 : 004 サンプル名 : STD1:10%TCA=2:1
 シリアル番号 : 0416 希釈率 : 1.000
 保存名 : AAAA0416

*** 計算結果 ***

No.	ピーク名	保持時間 [min]	高さ [mV]	面積* [mV*sec]	mg/l	mg/l	マーク	複合判定
1	d-ALA	14.523	15.23	2.83012x10 ²	1.000	1.000		B
合計				2.83012x10 ²	1.000	1.000		



Ch No. : データ解析 Ch. 1 計算方法 : 絶対検量線法
 カップ番号 : 002 サンプル名 : URINE
 シリアル番号 : 0405 希釈率 : 1.000
 保存名 : AAAA0405

*** 計算結果 ***

No.	ピーク名	保持時間 [min]	高さ [mV]	面積* [mV*sec]	mg/l	mg/l	マーク	複合判定
1	d-ALA	14.520	21.39	4.01766x10 ²	1.420	1.420		V
合計				4.01766x10 ²	1.420	1.420		

Fig: 4 標準試料 (1 mg/l、上)、及び実試料 (下) のクロマトグラム