報 文

チタン(IV)-ポルフィリン試薬を用いるヒト血清中微量成分の フローインジェクション分析

高村喜代子^{®1}, 中道 典宏¹, 松原 チヨ¹

Flow-injection analysis using the titanium(IV)-porphyrin reagent for determining
trace components of physiological significance in human serum

Kiyoko TAKAMURA¹, Norihiro NAKAMICHI¹ and Chiyo MATSUBARA¹

¹ Tokyo University of Pharmacy and Life Science, 1432-1, Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo 192-0392

(Received 28 November 2003, Accepted 30 January 2004)

A Ti-TPyP reagent, i.e., an acidic aqueous solution of oxo[5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrinato]titanium(IV) complex, was developed as a highly sensitive spectrophotometric reagent for determining traces of hydrogen peroxide. Following the addition of hydrogen peroxide to the reagent, a new absorption peak appeared at 450 nm due to the formation of its monoperoxo complex. The absorbance at 450 nm was found to be proportional to the hydrogen peroxide concentration with an apparent molar absorptivity of $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Based on this fact, we conducted a highly sensitive analysis of hydrogen peroxide using the reagent coupled with the flow-injection analysis (FIA) method with a detection limit of 0.5 pmol per test ($S/N=3$). In this study, the method was assessed for determining glucose, urate and galactose levels in human serum using the corresponding oxidase enzyme columns incorporated with the FIA system. The determinations of glucose and urate were successfully made with small sample sizes, i.e., 0.05 and 0.5 μl serum, respectively. The response was linear against concentrations ranging 1 ~ 1000 and 0.5 ~ 600 μM (5 ~ 5000 and 2.5 ~ 3000 pmol/test) for glucose and urate, respectively. The throughput rate was 40 samples per hour. Both cases required no sample pretreatment procedure, such as deproteinization or preconcentration, and the obtained results were consistent with those obtained by the conventional methods. The galactose level in serum was much lower than that of glucose and urate; however, the determination of galactose could be made by the present method using 20 μl of deproteinized serum. The response was linear against the galactose concentration in the range of 0.5 ~ 500 μM (10 ~ 10000 pmol/test). Galactose levels ranging over 0.54 ~ 1.46 mg/dl could actually be obtained for normal serum samples. The recovery values for 0.90 mg/dl (50 μM) galactose added to the samples were 96 ~ 104.9%.

Keywords : flow-injection analysis; Ti-TPyP reagent; glucose; urate; galactose.

1 緒 言

ヒト血清中グルコース及び尿酸量は臨床生化学分析における重要な検査項目であり、日常高頻度で測定されている。その測定法は感度が高いのみならず、目的成分に対する選択性が高く、血清中のマトリックス成分の影響を受け

難いことが要求される。また、採血量の軽減のため、分析試料のダウンサイズも望まれる。現在、グルコース及び尿酸の定量では、それぞれに特異的な酸化酵素を用いて各成分を酸化し、生成した過酸化水素をペルオキシダーゼ(POD)法^{1)~3)}などにより検出する方法が繁用されている。検出法の多くは、過酸化水素による酸化反応に基づく呈色、蛍光、あるいは発光反応である。この際、PODの水素供与体への選択性が非常に低いために、還元性共存物質

¹ 東京薬科大学: 192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1

の影響を受けやすいことが指摘されている⁴⁾。

血清尿酸は、グルコースに比べてその存在量が少ないので、より高感度な測定法が望まれる。一方、血中存在量が更に希薄なガラクトースは、先天性代謝異常症であるガラクトース血症の診断の指標として重要であるので、更に高感度な分析法が種々提唱されている^{5)~8)}。

既に著者らは、過酸化水素の高感度吸光分析試薬として Ti-TPyP 試薬 [oxo{5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrinato}titanium(IV) 錯体の強酸性水溶液] を開発した⁹⁾¹⁰⁾。本試薬は過酸化水素と反応してペルオキソ錯体 (モル吸光係数: $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 450 nm) を生成する。更に本試薬をフローインジェクション分析 (FIA) の検出系に組み込み、過酸化水素の高感度・迅速定量を可能にした。検出限界は 5 nM (0.5 pmol/test) であった¹⁰⁾¹¹⁾。

本報では、生体成分分析における本法の有効性を確かめるために、固定化酸化酵素カラム並びに Ti-TPyP 試薬による過酸化水素の検出部を組み込んだ FIA 系を構築して、ヒト血清中グルコース、尿酸及びガラクトースの定量を試みた。

2 実 験

2・1 試薬及び溶液調製

Ti-TPyP 試薬 (30 μM): {5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrinato}titanium(IV) (東京化成工業製) 10 mg を 5 M 塩酸 2 ml に溶解した後、1.6 M 過塩素酸 (グルコース及びガラクトースの定量時) あるいは 2 M 硫酸 (尿酸の定量時) を加えて全量を 500 ml とした¹⁰⁾¹¹⁾。調製した試薬は、メンブランフィルター (0.45 μm) を用いて汙過してから使用した。

グルコース標準溶液 ($1.00 \times 10^{-2} \text{ M}$): D-グルコース (試薬特級, 和光純薬製) 0.180 g を蒸留水に溶解して全量 100 ml とした。

ガラクトース標準溶液 ($1.00 \times 10^{-2} \text{ M}$): ガラクトース (試薬特級, 和光純薬製) 0.180 g を蒸留水に溶解して全量 100 ml とした。

尿酸標準溶液 ($1.00 \times 10^{-2} \text{ M}$): 尿酸 (東京化成工業製) 0.168 g を $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ 炭酸リチウム溶液に溶解して全量 100 ml とした。

グルコースオキシダーゼ (GOD) 溶液: GOD (起源: *Aspergillus niger*, E.C.1.1.2.4, SIGMA 製) 2400 U を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 2 ml に溶解した。

ウリカーゼ溶液: ウリカーゼ (起源: *Pig liver*, E.C.1.7.3.3, Biozyme 製) 10 U を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 2 ml に溶解した。

ガラクトースオキシダーゼ (GalOD) 溶液: GalOD (起源: *Dactylium dendroides*, E.C.1.1.3.9, SIGMA 製) 150 U を 0.2 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) 2 ml に溶解した。

アスコルビン酸オキシダーゼ (ACOD) 溶液: ACOD (起源: *Cucumis species*, E.C.1.10.3.3, フナコシ製) 200 U を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1 ml に溶解した。

2・2 固定化酵素カラムの作製

GOD 及びウリカーゼの固定化は、アミノプロピル化した多孔性ガラスビーズ¹²⁾を用い、van Zoonen らの方法¹³⁾により行った。すなわち、アミノプロピル化した多孔性ガラスビーズ 0.1 g に 2.5% グルタルアルデヒド溶液 5 ml 加えて、減圧下 30 分間振とうした後、常温常圧で更に 1 時間振とうした。水及び 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄した後、GOD 又はウリカーゼ溶液 2 ml を加え、氷冷しながら減圧下 1 時間振とうした。4℃ で 12 時間放置後、上記緩衝液で洗浄し、キャリアー溶液中に保存した。これを内径 1 mm のテフロンチューブ (長さ: GOD は 3 cm, ウリカーゼは 1 cm) に充填して酵素カラムとした。

GalOD の固定化は、アミノプロピル化した多孔性ガラスビーズをアシル化¹⁴⁾、その 0.1 g に 2 M 塩酸 2 ml と亜硝酸ナトリウムを加えて 30 分間氷浴中で反応させた後、GalOD 溶液を加えて 4℃ で 12 時間反応させた。0.2 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) で洗浄後、内径 1 mm, 長さ 10 cm のテフロンチューブに充填して GalOD 酵素カラムとした。

ACOD は Matsumoto らの方法で固定化した¹⁵⁾。CNBr-活性化セファロース 4B 0.2 g を 1 mM 塩酸に 10 分間浸した後、シンタードグラスで汙取し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄する。ACOD 溶液を加えて 4℃ で 24 時間反応させる。水洗後、未反応官能基を 15 mg/ml グリシン溶液を加えてブロックする。上記緩衝液 (5 M NaCl を含む) で洗浄後、内径 2 mm, 長さ 5 cm のテフロンチューブに充填して ACOD 酵素カラムとした。

2・3 装置及び測定方法

Fig. 1 に示すような 2 流路を組み込んだ FIA 系を構築した。ポンプは FIA 用ダブルプランジャーポンプ DMX-2300T (サヌキ工業製)、サンプルインジェクターはレオダイン 8125、流路には内径 0.5 mm のテフロンチューブを使用した。検出器には日本分光製 870-UV 型分光光度計 (光路長 10 mm) を使用した。

血清試料中のグルコース、尿酸及びガラクトースの測定は、キャリアー溶液としてそれぞれ 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.0), 0.2 M ホウ酸緩衝液 (pH 7.2), 及び 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) を用いて行った。検液並びに注入量は、それぞれ 100 倍に希釈した血清 5 μl , 10 倍に希釈した血清 5 μl , 及び血清 (希釈せず) 20 μl とした。ただし、ガラクトース測定の場合には、血清をあらかじめウルトラセント 10 (東ソー製) を用いて限外汉過した汉液を検液

Fig. 1 Flow diagram of the FIA system for determining glucose, urate and galactose

R1: carrier solution; R2: Ti-TPyP reagent (30 μ M); S: sample injector; EC: enzyme column; T: thermostat bath (75°C); MC: mixing coil (0.5 mm i.d., 15 m long); D: spectrophotometer (450 nm); W: waste

とした。

試薬溶液 (30 μ M Ti-TPyP 試薬) 並びにキャリア溶液は 0.4 ml/min の流量で送液した。酵素カラム中で生成した過酸化水素はミキシングコイル (15 m, 75°C) 中で Ti-TPyP 試薬と反応させ、生成したペルオキシ錯体の吸光度 (450 nm) をフローシグナルのピーク高さとして計測した。

3 結果及び考察

3.1 Ti-TPyP 試薬による血清中成分の定量

Ti-TPyP 試薬は過酸化水素と反応してペルオキシ錯体を生成する。この錯体の吸収スペクトルは 450 nm に吸収極大を示し、吸光度は過酸化水素濃度に比例し、モル吸光係数は $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である⁹⁾¹⁰⁾。既に著者らは Ti-TPyP 試薬を検出試薬とする FIA 法により、過酸化水素の高感度定量を可能にした¹⁰⁾¹¹⁾。そこで本報では、FIA 系に設置した酸化酵素カラム内で血清中のグルコース、尿酸あるいはガラクトースを酸化して過酸化水素を生成させ、それぞれの成分の高感度定量を行った。3 種の成分に対する酵素反応を次に示す。

Fig. 2 Effect of pH on the peak height of flow signal for glucose, galactose and urate

Concentration: glucose, 0.1 mM; galactose, 1.0 mM and urate, 0.1 mM

3.2 定量条件の検討

一般に酵素は固定化することにより安定性が増すが、反応の至適条件が溶液中とは異なることがある。そこで各酵素カラムの性能に対するキャリア溶液の pH の影響を調べた。Fig. 2 に示すように、GOD 及びウリカーゼの場合は pH 5.5~9 の範囲でほぼ一定のピーク高さが得られたが、GalOD では pH 8 付近で最大値を示した。これよりキャリア溶液の pH は、GOD では 6.0、GalOD では 8.0、ウリカーゼでは 7.2 に定めた。

次に各酵素カラムの長さがピーク高さに及ぼす影響を検討した (Fig. 3)。カラムが短いと反応時間が短くなり、酵素反応率が低下した。一方、カラムが長いと酵素反応率は高くなるが、試料の拡散のためピーク幅は広がり、ピーク高さが減少するとともに、単位時間当たりに測定できる

Fig. 3 Effect of enzyme column length on the peak height of flow signal for glucose, galactose and urate

Concentration: glucose, 0.1 mM; galactose, 1.0 mM and urate, 0.1 mM

Fig. 4 Typical response signals for the standard solutions of glucose, galactose and urate

Concentrations: Glucose and urate, a 20, b 40, c 60, d 80, e 100 μ M, Galactose, a 25, b 50, c 75, d 100, e 125 μ M

検体数も減少した。そこで定量の感度と迅速性を考慮して、GOD, GalOD 及びウリカーゼのカラムの長さをそれぞれ 3, 10 及び 1 cm に定めた。キャリアー溶液及び Ti-TPyP 試薬溶液の流量は、酵素反応並びに呈色反応全過程の効率と測定迅速性を考慮して、いずれも 0.4 ml/min に設定した。

以上の条件下で、1 時間当たり 40 検体の測定ができた。また、GOD, GalOD 及びウリカーゼについて、酵素反応と呈色反応の全過程を通じての反応率は、それぞれ 58.0, 52.6 及び 70.5% であった。GOD 及びウリカーゼカラムは 3 か月以上、GalOD カラムは 1 か月以上の繰り返し使用

Table 1 Characteristics of the proposed method for the determination of glucose, urate and galactose

	Glucose	Urate	Galactose
Linear range of response, μ M	1 ~ 1000	0.5 ~ 600	0.5 ~ 500
pmol/test	5 ~ 5000	2.5 ~ 3000	10 ~ 10000
Correlation coefficient	0.999	0.999	0.999
RSD ^a , %	0.64	0.83	0.86

a) 100 μ M, $n = 10$

が可能であった。

3.3 検量線及び精度

グルコース、ガラクトース及び尿酸の標準溶液で得た FIA フローシグナルの例を Fig. 4 に示す。3 者いずれの場合もピーク高さと濃度との間には広い濃度範囲で良好な直線関係 ($r = 0.999$) が得られた。また、100 μ M 標準溶液を用いた繰り返し実験による相対標準偏差 ($n = 10$) は、3 者いずれも 1% 以下であり、本法の高い信頼性が認められた (Table 1)。

3.4 共存物質の影響

血清試料への応用に先立ち、血清中に共存が予想される物質について測定値への影響を検討した。グルコース及び尿酸定量時には、それぞれ 100 倍及び 10 倍に希釈した血清を検液としているので、マトリックス量が低下して、共存物質の影響は相当に回避されることが予想される。実際にグルコースの場合は、アスコルビン酸は血清中正常値の 10 倍程度の共存でも、また Na^+ , K^+ , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cl^- などの無機イオン類、並びに各種アミノ酸類は 2000 倍以上の共存でも、定量値に対する妨害は見られなかった。同

Table 2 Effects of inorganic substances on the determination of galactose

Substance	Conc./M	Galactose found, % ^{a)}
NaCl	2×10^{-1}	101.6
KCl	1×10^{-2}	99.5
CaCl ₂	5×10^{-3}	99.0
MgCl ₂	5×10^{-3}	100.0
FeCl ₃	1×10^{-3}	98.7
CuCl ₂	1×10^{-4}	98.5
NH ₄ Cl	1×10^{-3}	99.4
NaBr	1×10^{-3}	101.3
NaNO ₃	5×10^{-3}	98.1
Na ₂ SO ₄	1×10^{-2}	99.9
NaH ₂ PO ₄	1×10^{-3}	99.3
Na ₂ CO ₃	1×10^{-3}	98.1

a) Concentration of galactose: 5.00×10^{-5} M

様に尿酸の場合も, これらの無機・有機物質は血清中正常値の 10 倍以上存在しても, 定量値に対する妨害は見られなかった。また尿酸の前駆物質であるキサンチン, ヒポキサンチンについても影響は見られず, ウリカーゼの基質特異性が高いことが確認できた。

ガラクトースの場合には, 血清を希釈せずに検液としていたので, 無機イオン類, アミノ酸類のほか, 単糖類についても定量値に対する影響を検討した。その結果を Table 2 及び 3 に示す。Na⁺, K⁺ は血清中正常値の 2 倍程度, Fe³⁺, Cu²⁺ は 5 倍以上共存しても影響は見られなかった。また, 各種アミノ酸類, 単糖類についても影響は見られず, ガラクトースを選択的に定量していることが分かった。

ただし, アスコルビン酸についてはその共存量が増すと, 高温における Ti-TPyP 錯体の接触作用により正誤差が生じる¹⁰⁾。このような場合には, プレカラムとして固定化 ACOD カラムを設置することにより, 血清中正常値の 10 倍量までのアスコルビン酸の影響が除去できた。また, システイン及びジヒドロキシアセトンが正誤差を与える傾向が見られるが, その機構は明らかではない。しかし, 血清試料中では, 解糖系の中間代謝物であるジヒドロキシアセトン濃度は低いと考えられ, またシステインはタンパク質と結合して限外透過時に除去されると考えられる。よってこの両者が遊離状態で検液中に存在する量はごく小さく, その影響は無視できると見られる。

以上の検討結果から, 3 者いずれの定量においても, 共存物質の影響は事実上無視できると考えられる。

3・5 血清試料への応用

3・5・1 血清中グルコースの定量 実試料として市販のコントロール血清 (SERACLEAR) 及びプール血清 (NESCOL, 共に日本商事製) 中のグルコースを定量した。更に, 本法の信頼性を確かめるため, 両者へのグルコースの添加回収実験を行った (Table 4)。正常域, 異常域血清

Table 3 Effects of organic substances on the determination of galactose

Substance	Conc./M	Galactose found, % ^{a)}
Glycine	1×10^{-3}	99.3
Alanine	1×10^{-3}	100.7
Valine	1×10^{-3}	99.3
Leucine	1×10^{-3}	100.0
Isoleucin	1×10^{-3}	98.6
Serine	1×10^{-3}	98.6
Threonine	1×10^{-3}	100.0
Phenylalanine	5×10^{-4}	100.0
Tyrosine	5×10^{-4}	98.1
Tryptophan	1×10^{-4}	101.5
Aspartic acid	1×10^{-3}	100.0
Asparagine	1×10^{-3}	101.4
Glutamic acid	1×10^{-3}	97.8
Glutamine	1×10^{-3}	100.7
Lysine	1×10^{-3}	98.6
Histidine	1×10^{-3}	99.0
Cysteine	5×10^{-6}	102.2
Cystine	1×10^{-3}	103.4
Cystic acid	1×10^{-3}	101.3
Methionine	1×10^{-4}	100.7
Proline	1×10^{-3}	100.8
Ascorbic acid	1×10^{-6}	98.6
Glucose	5×10^{-3}	100.0
Fructose	5×10^{-4}	101.4
Mannose	1×10^{-4}	97.6
Lactic acid	5×10^{-3}	100.2
Pyruvic acid	1×10^{-3}	100.2
Glycerol	1×10^{-4}	101.3
Glyceraldehyde	1×10^{-4}	98.7
Glyceric acid	1×10^{-4}	103.4
Glycerolphosphate	1×10^{-3}	100.0
Dihydroxyacetone	1×10^{-6}	103.9

a) Concentration of galactose: 5.00×10^{-5} M

共に定量値は表示値に一致した。これらの血清中には数十種類の成分が共存しているにもかかわらず, 添加回収率は 96.3~103.2% と良好であった。したがって, 本法によれば, 試料を希釈するほかにはなんら前処理することなく, グルコースを定量することができる。

16 種のヒト血清について, 本法と従来法である GOD-POD-4-アミノアンチピリン法のキット (グルコース B テストワコー, 和光純薬製) で得た測定値を比較したところ, 回帰直線式 $y = 0.976x + 3.60$ (y : 本法, x : キット法), 相関係数 $r = 0.982$ の直線関係が見られ, 両法のよい相関性が認められた。

既に FIA 法によるグルコースの定量では, グルコースデヒドロゲナーゼと NADH オキシダーゼによる反応で生じた過酸化水素を化学発光 (ルミノール) によって検出したとき, グルコース検出の直線範囲が $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3}$ M (RSD: <2.9%) という結果が報告されている¹⁶⁾。本法が簡易な吸光度検出を用いた FIA 法によって, 100 倍希釈の血清 5 μ l を検液として, $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-3}$ M (RSD: 0.64%) のグルコース定量を可能としたことは, 本法の高い実用性を示唆するものである。

Table 4 Determination of glucose and urate in serum

Serum	Glucose		Urate	
	Content/mg dl ⁻¹	Recovery ^{a)} , %	Content/mg dl ⁻¹	Recovery ^{b)} , %
SERACLEAR N ^{c)}	135 (122~138)	96.7	3.19 (2.8~3.4)	98.1
SERACLEAR NA ^{d)}	270 (270~306)	96.7	11.2 (9.3~11.3)	100.2
NESCOL X ^{c)}	115	102.2	4.10	95.9
NESCOL XA ^{d)}	243	103.2	9.46	99.3

a) Glucose added: 90.0 mg/dl (5.00 mM); b) Urate added: 4.20 mg/dl (0.25 mM); c) Normal serum; d) Abnormal serum; () : Content indicated

Fig. 5 Correlation between the serum urate levels obtained by the uricase-4-aminoantipyrine-MEHA and the proposed methods

Urate concentration: 1.0 mg/dl = 60 μM

3・5・2 血清中尿酸の定量 10 倍希釈した血清を検液として尿酸の定量を行った場合、Ti-TPyP 試薬中の過塩素酸によるタンパク凝集が生じ、FIA 流路に目詰まりを生じた。そこで試薬中の過塩素酸を 2 M 硫酸に替えた。試薬を硫酸酸性溶液にしたことによるシグナルのピーク高さへの影響は見られなかった。本法により市販のコントロール血清及びプール血清中の尿酸を定量した結果を Table 4 に示す。コントロール血清中の定量値は、正常域、異常域共に表示値とよく一致した。また、添加回収率は 95.9~100.2% であり、本法の信頼性が確認された。

22 種のヒト血清について、本法と従来法であるウリカーゼ-POD-MEHA (3-メチル-N-エチル-N-(β-ヒドロキシエチル)-アニリン) 法のキット (尿酸 B テストワコー, 和光純薬製) で得た測定値を比較したところ、回帰直線式 $y = 1.083x + 0.133$ (y : 本法, x : キット法), 相関係数 $r = 0.982$ の直線関係が得られた (Fig. 5)。両法の相関性は高いが、勾配が 1 より大きい。この原因は明らかではない

Table 5 Determination of galactose in serum

Serum	Content/mg dl ⁻¹	Recovery ^{a)} , %
SERACLEAR N ^{b)}	1.46	102.9
SERACLEAR NA ^{c)}	1.46	99.4
NESCOL X ^{b)}	0.93	102.4
NESCOL XA ^{c)}	1.43	102.9
A	0.54	96.8
B	0.71	96.0
C	1.44	105.0
D	1.06	104.9
E	1.22	104.8

a) Galactose added: 0.90 mg/dl (50 μM); b) Normal serum; c) Abnormal serum

が、両法に対する共存物質の影響の相違も一因と考えられる。

3・5・3 血清中ガラクトースの定量 健常人の血清中ガラクトースは極めて低濃度なので、検液調製時に血清を希釈することはできない。血清を希釈せずに検液として注入すると、測定値にはビリルビンの吸収 ($\lambda_{\max}$: 460 nm) に由来する正誤差が生じた。しかし血清中ビリルビンはほとんどがアルブミンと結合している¹⁷⁾、除タンパクすることによりビリルビンの妨害を除去することができる。そこで血清試料をあらかじめ限外濾過し、その濾液 20 μl を検液として注入した。

市販の正常域、異常域のコントロール血清及びプール血清、並びに 5 種類の健常人血清についてガラクトースを定量した結果を Table 5 に示す。健常人について得た定量値 0.54~1.46 mg/dl は、血中ガラクトースの基準値 (ガラクトースデヒドロゲナーゼ法による) が 4.3 mg/dl 以下¹⁸⁾とされていることから、妥当な値と考えられる。

また、ガラクトース標準溶液 (0.90 mg/dl, 50 μM) を用いて添加回収実験を試みたところ、回収率は 96.0~104.9% であり (Table 5)、本法の信頼性が確認された。

4 結 論

本報では、Ti-TPyP 試薬を用いる過酸化水素の呈色反応系を、固定化酸化酵素カラムを設置した FIA 系に検出部

として組み合わせて、血清中グルコース、尿酸及びガラクトースの定量に適用した。使用した酸化酵素の高い基質特異性、本呈色系による過酸化水素検出法の高感度性と共存物質の影響を受け難い特性、並びに FIA 法の高精度と迅速性が相まって、これら 3 種の微量成分は本法により感度・精度共に高く、かつ簡易迅速に定量された。

前述のキット法によるグルコース及び尿酸の定量では、数十 μl の血清試料を必要とする。これに対して本法では、その高感度性ゆえにグルコース及び尿酸はそれぞれわずか 0.05 及び 0.5 μl の血清試料で定量でき、分析試料のダウンサイズに成功した。

更に、血中含有量が極めて希薄なガラクトースの場合も、臨床分析の通常量である 20 μl の血清試料をもって、濃縮などの前処理なしに高感度・高精度の定量が可能であった。血中ガラクトースの基準値は、ガラクトースデヒドロゲナーゼ法で 4.3 mg/dl 以下、新生児マス・スクリーニング法 (Paigen phase 法) で 8 mg/dl 未満とされている¹⁷⁾。本法による検量線の直線範囲 (Table 1) は、9 $\mu\text{g}/\text{dl}$ ~ 9 mg/dl のガラクトース量に対応する。この結果から、生化学分析における本法の有用性が期待される。

Ti-TPyP 試薬は優れた呈色感度、試薬及び呈色体の安定性、共存物質の影響を受け難いことを特徴とするので、定量目的成分に応じた酵素カラムを FIA 系に組み込むことで、グルコース、尿酸及びガラクトースの 3 者の定量にとどまらず、更に広い応用が期待できる。

文 献

- 1) B. C. Madsen, M. S. Kromis: *Anal. Chem.*, **56**, 2849 (1984).

- 2) N. Beltz, W. Jaeschke, G. L. Kok, S. N. Gitlin, A. L. Lazrus, S. E. McLaren, D. Shakespeare, V. A. Mohnen: *J. Atmos. Chem.*, **5**, 311 (1987).
- 3) P. van Zoonen, D. A. Kamminga, C. Gooijer, N. H. Velthorst, R. W. Frei: *Anal. Chim. Acta*, **174**, 151 (1985).
- 4) P. Sharp: *Clin. Chim. Acta*, **40**, 155 (1972).
- 5) J. M. Henderson, F. W. Fales: *Clin. Chem.*, **26**, 282 (1980).
- 6) R. G. Wilson, P. R. Riordan, P. E. Hartmann: *J. Inher. Metab. Dis.*, **13**, 270 (1990).
- 7) 三留真珠美, 伊藤克敏, 荒川英俊, 前田昌子: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **49**, 355 (2000).
- 8) 伊藤克敏, 三留真珠美, 荒川英俊, 前田昌子: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **49**, 953 (2000).
- 9) C. Matsubara, N. Kawamoto, K. Takamura: *Analyst*, **117**, 1781 (1992).
- 10) K. Takamura, C. Matsubara: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **76**, 1873 (2003).
- 11) 松原チヨ, 中道典宏, 河本直樹, 高村喜代子: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **42**, 363 (1993).
- 12) M. Masoon, A. Townshend: *Anal. Chim. Acta*, **166**, 111 (1984).
- 13) P. van Zoonen, I. D. Herder, C. Gooijer, N. H. Verthorst, R. W. Frei: *Anal. Lett.*, **19**, 1949 (1986).
- 14) H. H. Weetall: "Methods in Enzymology", Vol. 44, p. 142 (1976), (Academic Press, New York).
- 15) K. Matsumoto, O. Hamada, H. Ukeda, Y. Osajima: *Anal. Chem.*, **58**, 2732 (1986).
- 16) N. Kiba, H. Koemado, M. Furusawa: *Anal. Sci.*, **11**, 605 (1995).
- 17) 上代淑人監訳: "ハーバー・生化学 原書 20 版", p. 374 (1986), (丸善).
- 18) 日本臨床増刊号: "血液・尿・免疫学的検査", p. 595 (1999), (日本臨床社).

要 旨

著者らは、既に過酸化水素の高感度吸光分析試薬として Ti-TPyP 試薬 [oxo{5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrinato}titanium(IV) 錯体の強酸性水溶液] を開発した。本試薬は過酸化水素と反応してペルオキシ錯体 (モル吸光係数: $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 450 nm) を生成する。本試薬を検出試薬としてフローインジェクション分析 (FIA) 系に組み込んだところ、過酸化水素の定量範囲は $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ (1.0 ~ 1000 pmol/test), 検出限界は 0.5 pmol/test ($S/N=3$) であった。そこで本報では、生体成分分析におけるこの方法の有効性を確かめるために、FIA 系に固定化酸化酵素カラムを設置して、ヒト血清中含有量がそれぞれ異なるグルコース、尿酸及びガラクトースの定量を試みた。グルコース及び尿酸は、それぞれ血清量 0.05 及び 0.5 μl で正常域、異常域試料共に定量可能であり、分析試料の少量化に成功した。また、これらに比して血清中含有量が極めて低いガラクトースも、20 μl の血清量で 9 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (0.5 μM) まで定量することができ、生化学分析における本法の実用性が示唆された。