電解化学発光検出フローインジェクション法による シュウ酸の定量

内 倉 和 雄*

(1989 年 12 月 16 日受理)

シュウ酸 (Ox)-tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) $\{Ru(bpy)_3\}^{2+}$ 電解化学発光系を利用した FIA 法を作成し、実試料への適用例として尿中シュウ酸の定量に応用した。キャリアーに蒸留水を用いる 2 流路 FIA で、試薬溶液は 10 mM 硫酸に $Ru(bpy)_3Cl_2$ を溶解して 0.12 mM とした。試薬溶液は電解反応器 (electrochemical reactor, ECR) を通過した後、フローセルの直前でキャリアーと合流し、混合した後、排出する。このとき生ずる光量を測定する。本法によれば 0~400 pmol の範囲で発光強度と良好な直線関係を示し、検出下限 ($S/N=3$) は 0.3 pmol であった。相対標準偏差 ($n=5$, 5 pmol) は 2.3% であった。尿中の Ox は尿を 1% アセトニトリル溶液で 1000~2000 倍に希釈し、Sep-Pak C18 で前処理することによって定量できた。

1 緒 言

シュウ酸 (Ox) は、植物や動物など生物中に存在し生理学、農学のみならず分析化学などにとって重要なものと言われている¹⁾。更に、臨床医学の範囲では、尿あるいは血中の Ox の測定が疾病診断・治療の目的で要求されている²⁾。これまで定量法としては、結晶沈殿法¹⁾、同位体希釈法³⁾、酵素法⁴⁾、修飾した電極を利用したもの⁵⁾や、クロマトグラフィーを利用した方法^{6)~9)}、などが報告されている。これらは、繁雑な処理が必要であること、分析時間が長いこと、選択性及び感度など、必ずしも十分でないと思われる。最近、Bard ら¹⁰⁾¹¹⁾ は、Ox と $Ru(bpy)_3^{2+}$ を含む溶液を電解するときには発光を観察し、発光反応機構や Ox の分析への応用について報告した。しかし、実用分析法としては十分でないと思われるので、流通系で連続的に電解することができ、電解反応器 (electrochemical reactor, ECR) を利用した FIA による高感度・選択的で迅速な測定法を開発し、尿試料に適用した。

2 実 験

2.1 試 薬

$Ru(bpy)_3^{2+}$ 溶液: 10 mM 硫酸に $Ru(bpy)_3Cl_2$ (Sigma) を溶かして 0.12 mM とした。Ox 溶液: シュ

ウ酸ナトリウム (標準試薬, 小宗化学薬品) を用時, 水に溶解して用いた。その他の試薬はすべて市販特級品を使用した。

2.2 装置と操作法

使用した FIA 装置を Fig. 1 に示す。ポンプは盛進製薬 PSU-2.5T を用いた。注入装置は Rheodyne 7125 に 10 μ l のサンプルループを付けて用いた。ECR は既報¹²⁾ と同様のもの、北斗電工ポテンシヨ・ガルバノスタット HA-101 により加電される。発光強度の測定は、浜松ホトニクスホトンカウンター C-1230 に光電子増倍管 R585 を付けた。フローセルはシリコンチューブ (内径 0.3 mm, 長さ 140 mm) を渦巻き状にして、アルミはく

Fig. 1 Schematic flow diagram of FIA system

C: carrier solution, flow rate 0.8 ml min⁻¹; R: reagent solution, flow rate 0.3 ml min⁻¹; P: pump; d. t: damper tubing, 0.5 mm i. d., 20 m length; I: injector, sample volume 10 μ l; ECR: electrochemical reactor; g. s: potentio-galvanostat; D: detector; R: recorder

* 日本大学理工学部: 101 東京都千代田区神田駿河台 1-8

の平面に固定したもので、光電子増倍管の受光部に張り付けて用いた。記録計は日本電子科学 U-228 で、FIA ピークを記録し、ピーク高さを測定し発光強度とした。

一方の流路は蒸留水をキャリアーとして 0.8 ml min^{-1} で送液し、他方は試薬溶液を 0.3 ml min^{-1} で送液した。試薬溶液は ECR に導かれ $80 \mu\text{A}$ で定電流電解を受け $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ から $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ に酸化される。両溶液はフローセルの直前で合流し、セル内で混合、流出する。試料は水に溶解し、その $10 \mu\text{l}$ をキャリアー流路に注入した。

2.3 定量操作

Sep-Pak C18 は水、アセトニトリル各 5 ml で洗浄した後、 1% アセトニトリル溶液を通過し、平衡としたものを用いた。

尿は 1% アセトニトリルで $1000\sim 2000$ 倍希釈し、Sep-Pak C18 カラムに添加する。流出液のはじめの 1.5 ml を捨て、次の 0.5 ml を集め、その $10 \mu\text{l}$ を FIA に注入する。

3 結果と考察

3.1 検出条件の検討

キャリアー及び試薬溶液の流量をそれぞれ $0.8, 0.3 \text{ ml min}^{-1}$ として、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 濃度、pH 及び電解電流の発光強度への影響について検討した。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 濃度が増加するにつれて、発光強度は増大し、 $0.1\sim 0.24 \text{ mM}$ で一定となった (Fig. 2) ので、 0.12 mM を採用した。次に、pH の影響について、硫酸及び 10 mM リン酸緩衝液で試薬溶液を調製したものを用いて調べた。pH $2\sim 7$ と上昇するにつれて発光強度及びノイズ共に増大した。 S/N を考慮し pH 2.8 を採用し、硫酸濃度を 10 mM とした。電解電流は $70\sim 140 \mu\text{A}$ の範囲

Fig. 2 Effect of $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ concentration in the reagent solution on the relative chemiluminescence intensity

で調べた。電流を増加すると、強度は増大した。しかし、ノイズも同様に増大し、 S/N はほぼ一定であったので、 $80 \mu\text{A}$ とした。採用した条件では、ノイズは無視できる程度であり、キャリアー溶液の流量 $0.7\sim 1.1 \text{ ml min}^{-1}$ において、発光強度はほぼ一定であった。

3.2 検量線、感度と精度

2.2 で示した条件で直線性について調べた。Ox 400 pmol までは絶対量とピーク高さとは原点を通る直線関係が認められた。Ox $2\sim 6 \text{ pmol}$ での FIA ピークを Fig. 3 に示す。又、Ox 5 pmol を用い繰り返し測定したところ、相対標準偏差 ($n=5$) は 2.3% と良好な再現性を示し、検出感度は 0.3 pmol ($S/N=3$) であった。これは、既報¹¹⁾¹³⁾に比べ、約 10 倍高感度である。

3.3 選択性と共存物質の影響

実試料への応用を目的として選択性について調べた結果を Table 1 に示す。有機酸、アミノ酸、還元性物質及び無機塩類などについてほとんど発光を認めない。一方、発光したものについても、シュウ酸のそれに比較して 0.3% 以下の強度であった。その中でトリプトファン (Trp) は Ox の約 2 倍の強度で発光した。一方、Noff-singer ら¹³⁾は pH $4\sim 6$ において脂肪族アミン類が発光すると報告しているが、本実験条件である pH 2.8 では Ox に比較して 0.1% 以下の発光強度であった。又、Table 1 の物質について $1 \mu\text{M}$ Ox に等モル共存させた試料溶液を調製し、共存の影響を調べた結果、アスコルビン酸について妨害が認められ、発光強度は 93% 減少した。本反応は $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ と Ox との酸化還元反応

Fig. 3 Typical FIA peaks for the determination of oxalic acid

Oxalic acid (pmol): a, 2; b, 4; c, 8; d, 12; e, 16

Table 1 Relative chemiluminescence intensity of various compounds

Compound	RCI
Oxalic acid	100.0
Formic acid	0.0
Acetic acid	0.0
Lactic acid	0.0
Fumaric acid	0.0
Tartaric acid	0.0
Citric acid	0.0
Glycine	0.0
Alanine (DL)	0.2
Valine (DL)	0.1
Leucine (DL)	0.0
Threonine (DL)	0.2
Aspartic acid (DL)	0.0
Glutamic acid	0.0
Lysine (L)	0.0
Arginine (DL)	0.0
Phenylalanine (DL)	0.0
Tryptophan (DL)	198.0
Proline (L)	0.0
Taurine	0.0
Glucose	0.0
Galactose	0.3
Arabinose (L)	0.1
Ribose (D)	0.3
Ascorbic acid	0.0
Glutathione, reduced	0.0
Riboflavin	0.0
Thiamine	0.0
Hydrogen peroxide	0.0
Perchloric acid	0.0
Sodium chloride	0.0
Potassium chloride	0.0
Ferric chloride	0.0
Zinc sulfate	0.0
Manganese chloride	0.0
Sodium bicarbonate	0.0
Sodium metabisulfite	0.0
Phosphoric acid	0.0

RCI : relative chemiluminescence intensity

によるものであり、アスコルビン酸が競争的に酸化を受け、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ の濃度が減少したためと考えられる。今回、妨害を示さないグルタチオン（還元型）など、Ox に比較して易酸化性の物質は多量に共存するときには妨害も予想される。

3・4 実試料への応用

応用例として尿中 Ox の定量を検討した。本 FIA で発光する Trp は尿中に存在している¹⁴⁾ため、Trp と Ox の分離について、試料液を前処理用ミニカラムに添

加し、Trp を吸着除去した後、その流出液を FIA に供する方法を採用し、最適条件を調べた。Trp 及び Ox それぞれ 500 nM を含む水及び水-アセトニトリル混液を Sep-Pak 7 種類及び Bond Elut SCX についてそれぞれ添加し、その流出液を 200 μl ごとに分取した。各分画について発光強度を測定し、破過曲線を作成した。又、Trp 及び Ox 単独溶液についても調べた。Sep-Pak の silica, alumina, diol, -CN, florisil, accel- QMA 及び Bond Elut SCX については有効な分離が得られなかった。Sep-Pak C18 の破過曲線を Fig. 4 に示す。試料溶液を水とすると、Trp は流出しないが、流出液中の Ox 濃度は試料液のそれに比較して低く、一定値を示さなかつ

Fig. 4 Elution profiles for Ox and Trp from Sep-Pak C18 cartridge column

Sample solution : a, H_2O ; b, 1 % CH_3CN ; c, 2 % CH_3CN . Sample concentrations : 500 nM Ox and Trp, respectively

Fig. 5 FIA signals obtained from urine sample

a : diluted urine; b : treated with C18 cartridge column

Table 2 Determination of oxalic acid in urine and its recoveries

Sample	Oxalic acid/mg l ⁻¹		Recovery ^{b)} , %
	Urine	Urine + standard ^{a)}	
1	32.0	70.5	98.7±2.4
2	28.3	68.5	103.0±2.2
3	26.2	65.8	101.5±2.8
4	41.8	83.1	105.9±2.2
5	19.5	60.2	104.3±3.0
6	30.1	69.9	102.1±2.9
7	37.4	75.1	96.7±1.5
8	20.0	61.2	105.6±2.5

a) Oxalic acid was added to urine (39.0 mg l⁻¹); b) Mean±S.D., n=5.

た。2% アセトニトリルのときは、12 分画から Trp の流出が見られ、定常部も短くなった。アセトニトリルを 1% とすると 3~14 分画で一定濃度を示し Trp は流出しない。このときの Ox の濃度は試料液の 93% であった。以上の結果と尿中 Ox 濃度とから 2・3 を採用した。尿についての FIA ピークの一例を Fig. 5 の b に示す。a は希釈した尿を直接 FIA に注入したものである。一時尿について 2・3 に従って測定した結果及び添加回収率を Table 2 に示す。回収率は 97~105% と良好で、再現性も良く、共存物質による影響は無視できるものと考えられる。又、測定した Ox 濃度は健康人の数値⁶⁾¹⁵⁾とよく一致した。

以上、電解化学発光検出法を用いた FIA による Ox の選択的で高感度・迅速な測定法が確立できた。本法は操作性に優れ、日常分析にも利用可能と思われる。更に、別法との比較などによって、より信頼度の高い方法になると考えられる。又、HPLC のポストカラム検出法に応用することも可能と思われる。

文 献

- 1) A. Hodgkinson: "Oxalic Acid in Biology and Medicine" (1977), (Academic Press, New York).
- 2) W. G. Robertson and M. Peacock: *Nephron*, **26**, 105 (1980).
- 3) A. I. Vogel: "Textbook of Quantitative Inorganic Analysis", pp. 243, 320, 577 (1962), (Longmans, London).
- 4) A. R. Hilary, N. M. Kennedy, S. M. Kulwant I. M. Alasdair: *Clin. Chim. Acta*, **182**, 247 (1989).
- 5) A. N. R. Mohammad, G. G. George, G. O. Neto:

Anal. Chem., **58**, 523 (1986).

- 6) S. Imaoka, Y. Funac, Y. Sugimoto, N. Hayahara, M. Maekawa: *Anal. Biochem.*, **128**, 459 (1983).
- 7) R. P. Singh, G. H. Nancollas: *Anal. Lett.*, **19**, 1487 (1986).
- 8) M. S. Leonel, P. B. Richard: *J. Chromatogr.*, **414**, 161 (1987).
- 9) H. A. Moye, M. H. Malagodi, D. H. Clarke, C. J. Miles: *Clin. Chim. Acta*, **114**, 173 (1981).
- 10) I. Rubinstein, A. J. Bard: *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 512 (1981).
- 11) I. Rubinstein, R. M. Charles, A. J. Bard: *Anal. Chem.*, **55**, 1580 (1983).
- 12) 百瀬明子, 内倉和雄, 桃沢洋三: 分析化学, **32**, 142 (1983).
- 13) J. B. Noffsinger, N. D. Danielson: *Anal. Chem.*, **59**, 865 (1987).
- 14) 日本生化学会: "生化学データブック", p. 1602 (1980), (東京化学同人).
- 15) R. K. Kobos, T. A. Ramsey: *Anal. Chim. Acta*, **121**, 111 (1980).

☆

Determination of oxalate by FIA with electrogenerated chemiluminescence detection. Kazuo UCHIKURA (Department of Pharmacy, College of Science & Technology, Nihon University, 1-8, Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101)

A selective and sensitive method for the determination of oxalic acid using the electrogenerated chemiluminescence (CL) system, oxalate-Ru(bpy)₃²⁺, was described. Oxalate was reacted with Ru(bpy)₃³⁺ continuously prepared from Ru(bpy)₃³⁺ with an electrochemical reactor (ECR, home-made). The dual channel FIA apparatus was comprised of a delivery pump for both carrier and reagent solutions, a sample injector, damper tubing, the ECR and a photon counter. The oxidation potential of the working electrode in the ECR was maintained with a potentiogalvanostat. CL intensity was measured with a photon-counter which recorded FIA peaks graphically. The carrier solvent was H₂O (flow rate, 0.3 ml/min⁻¹) and reagent solution prepared in 10 mM H₂SO₄ to contain 0.12 mM Ru(bpy)₃Cl₂ (flow rate, 0.8 ml/min⁻¹). The sample (10 µl) was injected into the carrier stream. Linearity was obtained up to 16 pmol for oxalate. The detection limit was 0.3 pmol (S/N=3). The relative standard deviation was 2.3% (n=5, 5 pmol). This method was successfully applied to the determination of oxalate in urine.

(Received December 16, 1989)

Keyword phrases

FIA; oxalate determination; chemiluminescence detection; tris(bipyridine)ruthenium complex; urine sample.