[Jpn. J. Hosp. Pharm.]
— 般 論 文 —
15(3) 209—214 (1989)

HPLC-蛍光検出法による過酸化水素の定量および

その応用としての血漿 L-(+)-乳酸測定

鈴木 誠^{*1}, 高柳美行^{*2}, 八代 有^{*3}

名古屋通信病院薬剤科^{*1}

愛知県赤十字血液センター^{*2}

名古屋市立大学薬学部^{*3}

Determination of Hydrogen Peroxide by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorimetric Detection and Its Application to the Measurement of Plasma L-(+)-Lactate

MAKOTO SUZUKI^{*1}, MIYUKI TAKAYANAGI^{*2}, and TAMOTSU YASHIRO^{*3}

Department of Pharmacy, Nagoya Teishin Hospital^{*1}

Aichi Prefecture Red Cross Blood Center^{*2}

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University^{*3}

(Received March 13, 1989)

A sensitive and specific method for the determination of hydrogen peroxide by high performance liquid chromatography is developed. It is based on elimination of the native fluorescence of 5-hydroxytryptamine by an oxidative reaction between 5-hydroxytryptamine and hydrogen peroxide in the presence of peroxidase. Under the described conditions, hydrogen peroxide was determined in the concentration range of 0.5–10 μ M; the within-assay coefficients of variation (C.V.s) were 2.41% or less, with a mean recovery of 103.2% against additional hydrogen peroxide in the samples. This system can be utilized for the determination of plasma L-(+)-lactate using L-(+)-lactate oxidase. The detectable range of L-(+)-lactate was 0.5–8.0mM; C.V.s were 6.76% or less.

Keywords—hydrogen peroxide; high performance liquid chromatography; peroxidase from horseradish; 5-hydroxytryptamine; fluorimetric detection; plasma L-(+)-lactate; L-(+)-lactate oxidase

最近の医療の進歩に伴って、疾病診断の基礎的資料を提供する臨床化学分析の重要性は益々増加している。これは生体試料の分析により、多くの临床上重要な知見が得られるためである。これら生体試料の分析には、過酸

化水素の生成、定量という一連の酵素反応を利用する場合が多くみられ、本共役反応の応用範囲はさらに拡大の方向にある。

一方、過酸化水素の定量法についても種々報告され、呈色試薬としてはロイコクリスタルバイオレット^{1,2)}、2,2'-アジノ-ジ(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)³⁾、やその他^{4,5)}、また蛍光試薬としてはスコボレチン⁶⁾、ジアセチルジクロロフルオレッセン⁷⁾、*p*-ヒドロキシフェニルプロピオン酸⁸⁾、ホモバニリン酸⁹⁾、その他^{10,11)}が広く使用されている。しかし一般的には、生体

^{*1} 名古屋市東区泉2-2-5; 2-2-5, Izumi, Higashi-ku, Nagoya-shi, 461 Japan

^{*2} 愛知県瀬戸市南山口町539-3; 539-3, Minamiya-maguchi-cho, Seto-shi, Aichi, 489 Japan

^{*3} 名古屋市瑞穂区田辺通3-1; 3-1, Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya-shi, 467 Japan

試料中の各成分は微量であることより、それら成分の測定に当っては、より高感度な試薬や方法の開発が期待されている。

先に著者らは、5-ヒドロキシトリプタミン(5-HT)が過酸化水素の存在下、ペルオキシダーゼにより酸化され、本来5-HTの有する自然発光が消失する反応を見出した。そこで本反応を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による過酸化水素定量法を開発した。

他方、L-(+)-乳酸は生体において、Embden-Meyerhof回路の最終代謝産物として、ピルビン酸より生成されるが、その後血液を介して肝臓へ移送され、グリコーゲンに再生される。このL-(+)-乳酸の血中濃度は、各種の疾病、例えば糖尿病、心疾患、ショック症候群等のEmbden-Meyerhof回路活性化の指標として、その測定値が評価されている。

血漿 L-(+)-乳酸の測定については、酵素法として L-(+)-乳酸脱水素酵素^{12,13)}、L-(+)-乳酸酸化酵素^{14,15)}、L-(+)-乳酸2-モノオキシゲナーゼ¹⁶⁾の使用法等の報告がある。しかし、これらの方法には、煩雑な操作、測定所要時間の長さ等の問題点がいくつか存在する。また今日、L-(+)-乳酸電位法¹⁷⁾、既存法の改良¹⁸⁾等が報告されている中で、著者らも先の過酸化水素の新定量法を基にしたL-(+)-乳酸測定法を検討、確立した。

方 法

1. 試 薬

5-HT、尿酸、ヒト血清アルブミン、L-(+)-乳酸リチウム、L-(+)-乳酸測定キットはシグマ社(St. Louis, MO, U.S.A.)、ベディオコッカス属の細菌由来のL-(+)-乳酸酸化酵素(EC 1.1.3.2)は東洋醸造(静岡)、30%過酸化水素水は三菱ガス(東京)、西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼ、ビリルビン、ブドウ糖、アスコルビン酸、トリクロル酢酸(TCA)、およびその他の試薬は和光純薬(大阪)よりそれぞれ入手した。

2. 標準溶液

作業曲線作成用の過酸化水素液の調製に際しては、まず30%過酸化水素水の過マンガン酸カリウム滴定法による標定を行い、さらに精製水を用いた希釈で0.5~10 μ Mの標準液を得た。

また同じくL-(+)-乳酸液については、48mgのL-(+)-乳酸リチウムを精製水に溶解、全量を50mlとした後、精製水で希釈し0.5~8.0mMの標準液とした。

3. HPLC 分析条件

クロマトグラフィーは島津製作所製(京都)のLC-4Aシステムを使用した。本システムはLC-4Aポンプ、

SIL-1Aインジェクター、RF-530発光検出器を備えていた。また試料の分離はShim-Pack CLC-ODS逆相系分析カラム(150 $\times$ 6mm ϕ)、移動相は40mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)およびメタノールの混液(4:1, v/v)、流速は1.5ml/min、さらに検出波長は302nm(励起)および350nm(測定)をそれぞれ用いた。

4. 過酸化水素の定量手順

0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0)0.5mlと50 IU/mlのペルオキシダーゼ溶液0.1mlの混液中に、75 μ Mの5-HT溶液0.1mlおよび試料0.2mlを加え、37 $^{\circ}$ Cにて10分間インキュベートする。反応の停止は20% TCA溶液0.5mlの添加により実施し、ゲルマンサイエンス社(東京)のEkicrodisk 13メンブランフィルターにて反応液をろ過後、得られたろ液10 μ lを用いてHPLC分析を行う。試料中の過酸化水素濃度は、標準液より得た作業曲線から求める。

5. 血漿 L-(+)-乳酸の測定手順

1.0g/dlの硫酸亜鉛溶液0.5ml中に、試料血漿20 μ lおよび0.06M水酸化バリウム溶液0.5mlを加え、十分に攪拌する。2500 $\times$ gにて10分間遠心後、その上清50 μ lを取り、0.1Mリン酸緩衝液(pH 6.5)1.0mlに添加する。さらに75 μ M 5-HT溶液、50 IU/ml ペルオキシダーゼ溶液、1.0 IU/ml L-(+)-乳酸酸化酵素溶液のそれぞれ0.1mlずつを加え、十分に攪拌後、37 $^{\circ}$ Cにて15分間インキュベートする。反応の停止は20% TCA溶液0.5mlの添加により実施し、本液のメンブランフィルターろ液10 μ lを用いHPLC分析を行う。試料血漿中のL-(+)-乳酸濃度は、標準液より得た作業曲線から求める。

また、同一試料血漿につき、L-(+)-乳酸測定キットを使用した測定も並行して行った。

結 果

1. 5-HT およびその誘導体の有する自然発光の消光反応

一般にインドール化合物は自然発光を有するが、その一部、例えば5-HT、5-ヒドロキシ-N ω -メチルトリプタミン、5-ヒドロキシトリプトファンにおいては、過酸化水素の存在下でペルオキシダーゼによる酸化反応を受け、その自然発光は減衰した(Table 1)。本法は5-HTを基質として採用しているが、これは他の化合物に比較し、より高感度であることに由来する。

また、インドール化合物のうち、5位のヒドロキシル基が修飾されたもの、又は存在しないものについては、本法条件下での消光反応が認められなかった。

Table 1. Oxidation of Some Indole Compounds under the Proposed Conditions

Compound*	Relative peak area for fluorescence elimination to the reagent blank (%)
5-Hydroxytryptamine (5-HT)	22.5
5-Methoxytryptamine	0
Tryptamine	0.1
5-Hydroxy- <i>N</i> -methyltryptamine	12.4
5-Hydroxytryptophan	10.9

* The concentration of each compound was 75 μ M.

The concentration of hydrogen peroxide in a sample was 5.1 μ M.

Fig. 1. A Typical Chromatogram of Standard Materials under Proposed Conditions

Peaks: 1=5-hydroxytryptophan; 2=5-hydroxytryptamine; 3=5-hydroxy-*N*-methyltryptamine; 4=tryptamine; 5=5-methoxytryptamine.

The concentration of each indole compound in the substrate solution was 75 μ M and the concentration of hydrogen peroxide in a sample was 5 μ M.

2. HPLC による 5-HT 分析

本稿で述べる過酸化水素および血漿 L-(+)-乳酸の測定は、5-HT の減少量分析を基礎としているため、反応液中の残存 5-HT の HPLC 分析条件の検討は十分に行っ

た。その結果、血中共存物質の干渉を受けにくいとの観点から、多々ある報告¹⁹⁻²¹⁾のうち、柳沢らの提案する条件を前述の通り採用した。また、この HPLC 条件下での各種インドール化合物のクロマトグラムは、Fig. 1 に

示す通りである。

3. 反応条件

10 μ M以下の過酸化水素の定量に関しては、基質 5-HT 濃度が 75 μ M の場合 (検討濃度範囲: 7.5~940 μ M), 最も高感度な HPLC 分析結果を与えた。また 50IU/ml のペルオキシダーゼ溶液, 20% の TCA 溶液, および pH 7.0 の 0.1M リン酸緩衝液の至適試薬条件を得 (各試薬の検討濃度範囲: 5~500IU/ml, 10~30%, pH 5.7~8.0), 本法に採用した。さらに反応温度は 37°C にて最も高い反応性を示し, Fig. 2 の通りの経時変化が見られたことから, インキュベーション時間は10分間に設定した。

一方, 過酸化水素定量法の応用としての 8mM 以下の血漿 L-(+)-乳酸測定に関しては, 1.0 IU/ml の L-(+)-乳酸酸化酵素溶液の採用により, 先の過酸化水素定量における試薬条件のうち, 0.1M リン酸緩衝液の pH のみを 6.5 に変更するとき (検討 pH 範囲: 5.7~8.0), 最も感度の良い測定法となった。また 37°C の反応温度下では, 反応がプラトーに達するまでに必要なインキュベーション時間は, 15分間であった。

4. 過酸化水素定量法の吟味

標準液より得た作業曲線では, 過酸化水素濃度とピーク面積の間における良好な直線性が認められた ($n=7$,

Fig. 2. Time-course of Oxidation of 5-Hydroxytryptamine in the Presence of Hydrogen Peroxide and Peroxidase at 37°C. The concentrations of hydrogen peroxide in samples were 2.0 (●), 5.0 (■), and 8.0 (▲) μ M, respectively.

$r=0.994$). また本法の定量限界は 0.5 μ M を示した。さらに 2.0, 5.0, 8.0 μ M の標準液からは, C.V.=2.47% 以下 (各濃度 $n=10$) との良好な同時再現性試験結果を得, 回収率も 97.4~103.2% であった。

5. 血漿 L-(+)-乳酸測定法の精査

ヒト血漿中に 1.48, 2.83, 4.15mM の L-(+)-乳酸を含む試料についての, 同時再現性試験結果は C.V.=6.76% 以下 (各濃度 $n=10$), 回収率は 96.2~106.3% であった。また, 本法による測定結果と他法による測定値との相関を検討し, Fig. 3 に示した結果を得た。両者間の回帰式は $y=1.10x-0.282$, 回帰係数は $r=0.991$ ($n=20$) であり, 一次相関が認められた。

一般に血中物質を測定する場合, 共存物質の干渉を考慮しなければならない。本法についても, アルブミン, ビリルビン, アスコルビン酸, 尿酸, ブドウ糖につき, 各々の影響を調べた。その結果は Table 2 に示す通りで, これら物質が本法に対する妨害物質とはなり得ないことが明らかとなった。

考 察

本稿では過酸化水素の高感度定量法とその応用について述べたが, その測定原理は 5-HT の有する自然螢光の過酸化水素による消光反応に由来する。この反応のメカニズムについては, 5-HT のヒドロキシル基と 2 級アミンからの脱水素反応と推定したが, これはインドール環

Fig. 3. Correlation between the Results of the Determination of Human Plasma L-(+)-Lactate by the Proposed Method and the Kit Method.

Table 2. Effects of Some Plasma Components on the Assay of Human Plasma L-(+)-Lactate*

Agent	Concentration (mg/dl)	Range of recovery (%)
Albumin	2.2**, 4.5**, 9.0**	96.7-105.0
Bilirubin	3.0, 6.0, 10.0	98.9-106.7
Ascorbic acid	3.0, 6.0, 10.0	99.4-103.0
Uric acid	4.2, 8.3, 16.7	98.3-106.1
Glucose	75, 150, 300	96.7-103.3

*Samples were prepared with human pooled plasma (n=5); the concentration of L-(+)-lactate was 3.1 μ M.

**Units for albumin are expressed in g/dl.

の5位のヒドロキシル基を欠くとき、またはエステル化された化合物では、蛍光量の減少が認められなかった点に基づく (Table 1).

一方、通常過酸化水素の測定法の感度は、分光光度法^{1,2)}や電位差法²¹⁾で 10^{-5} M 以上、化学発光法²²⁻²⁴⁾で 10^{-9} M 以下であることと比較し、本法では 5×10^{-7} M とそれらの中間に位置した。従来法では容易に測定できなかった濃度領域での測定を可能とした点においても、今回の方法の利用価値の高さが推察された。

また応用例としての血漿 L-(+)-乳酸測定法では、測定範囲も 0.5~8.0mM と有用で、アルブミン、ビリルビン、アスコルビン酸、尿酸、ブドウ糖といった血中共存物質の影響も無視できることより、高精度な測定を可能とした。さらに既存法との良好な相関関係も得られ (Fig. 3), ひいては測定結果の信頼性も高いことから、本法の臨床化学分析の分野での活用が期待される。

なお、本論文の内容の一部は、第26回日本臨床化学会年会 (浜松, 1986), および第27回日本臨床化学会年会 (東京, 1987) で、口頭発表を行った。

文 献

- H. A. Mottla, B. E. Simpson, and G. Gorin, *Anal. Chem.*, **42**, 410-411 (1970).
- M. Takayanagi, S. Goto, I. Hasegawa, T. Fukuda, M. Kumagai, T. Naito, and T. Yashiro, *Jap. J. Clin. Chem.*, **14**, 337-341 (1985).
- M. Takayanagi, Y. Morishima, S. Goto, I. Hasegawa, T. Fukuda, and T. Yashiro, *Ann. Rept. Pharm. Nagoya City Univ.*, **31**, 38-44 (1983).
- L. L. Solomon and J. E. Johnson, *Anal. Chem.*, **31**, 453-456 (1956).
- T. Hauser and M. Kolar, *Anal. Chem.*, **40**, 231-232 (1968).
- W. A. Andrease, *Nature (London)*, **175**, 859-860 (1955).
- A. S. Keston and R. Brandt, *Anal. Biochem.*, **11**, 1-5 (1966).
- K. Zaitzu and Y. Ohkura, *Anal. Biochem.*, **109**, 109-113 (1980).
- G. G. Guilbault, P. Brignac, Jr., and M. Zimmer, *Anal. Chem.*, **40**, 190-196 (1968).
- G. G. Guilbault, P. Brignac, Jr., and M. Juneau, *Anal. Chem.*, **40**, 1256-1263 (1968).
- T. Konagaya, H. Iwai, and S. Akihama, *Jap. J. Clin. Chem.*, **12**, 221-226 (1983).
- H. Durlait and M. Contat, *Anal. Chem.*, **52**, 2109-2112 (1980).
- T. Yao, Y. Kobayashi, and S. Musha, *Anal. Chim. Acta*, **138**, 81-85 (1982).
- I. Karube, T. Matsunaga, N. Teraoka, and S. Suzuki, *Anal. Chim. Acta*, **119**, 271-275 (1980).
- F. Mizutani, K. Sasaki, and Y. Shimura, *Anal. Chem.*, **55**, 35-38 (1983).
- M. Mascini, G. Palleschi, and M. Moscone, "Proceedings of the International Meeting on Chemical Sensors", Kodansha, Tokyo, 1983, p. 603.
- T. Tsuchida, H. Takasugi, K. Yoda, K. Takizawa, and S. Kobayashi, *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 837-841 (1985).
- 藤川 淳, 小松田郁代, 井上桃絵, 丸岡悦子, 今鷹

- 耕二, 仁科甫啓, 臨床化学, 14, 198-203(1985).
- 19) T. Flatmark, S.W. Jacobsen, and J. Haavik, *Anal. Biochem.*, 107, 71-74 (1980).
- 20) M. Yanagisawa, H. Hasegawa, and A. Ichiyama, *J. Biochem.*, 92, 449-456 (1982).
- 21) M. Koyama, Y. Sato, M. Aizawa, and S. Suzuki, *Anal. Chim. Acta*, 116, 307-314(1980).
- 22) W.A. Armstrong and W. J. Humphreys, *Can. J. Chem.*, 43, 2576-2584 (1965).
- 23) H. R. Schroeder and F. M. Yeager, *Anal. Chem.*, 50, 1114-1120 (1978).
- 24) H. Arakawa, M. Maeda, and A. Tsuji, *Anal. Biochem.*, 97, 248-254 (1979).