Titanium (IV)-ポルフィリン錯体を吸光分析試薬とする血清尿酸の定量

松原チヨ,* 横井祐太, 中道典宏, 高村喜代子

東京薬科大学

Spectrophotometric Determination of Uric Acid in Serum Using a Titanium (IV)-Porphyrin Complex

Chiyo MATSUBARA,* Yuta YOKOI, Norihiro NAKAMICHI,
and Kiyoko TAKAMURA

Tokyo College of Pharmacy, 1432-1, Horinouchi, Hachioji-shi,
Tokyo 192-03, Japan

(Received September 14, 1993)

Aqueous solution of oxo[5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrinato]titanium (IV) complex, a Ti-TPyP reagent, was found to be very useful for the spectrophotometric determination of hydrogen peroxide. The reagent ($\lambda_{\max}$ 432 nm) reacts with hydrogen peroxide to form a monoperoxocomplex, resulting in a significant decrease of the absorbance at 432 nm. The decrease (ΔA) in absorbance was proportional to the concentration of hydrogen peroxide.

The Ti-TPyP reagent was successfully applied to the assay of uric acid in the serum, using uricase to produce hydrogen peroxide through enzymatic oxidation. Using only 5 μ l serum, a linear relationship was obtained between ΔA and uric acid concentration in the serum ranging from 5×10^{-6} to 1×10^{-3} M. The apparent molar ΔA of uric acid was $2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The relative standard deviation of repeated runs ($n=8$) was 2.8% at 3.77×10^{-4} M uric acid. The analytical recovery of uric acid (5×10^{-4} M) added to the serum was 96.8 to 105.0%. No pre-concentration and deproteinization were required to determine uric acid in the serum by the present method because of the high sensitivity and selectivity of the Ti-TPyP reagent for hydrogen peroxide.

Keywords—Ti-TPyP reagent; oxo[5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrinato]titanium (IV); peroxo[5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrinato]titanium (IV); hydrogen peroxide; uric acid assay; uricase

緒

言

血清中の尿酸測定は、痛風の診断、あるいは治療の指標として汎用されている代表的な臨床化学検査の1つである。この他にも血清尿酸値は白血病、糖尿病などでは高くなり、また肝疾患、キサンチン尿症では、低値を示すことが報告されており、これらの疾病においても病態の把握に有用であることが指摘されている。¹⁾ 血清尿酸の定量法として古くから用いられてきた化学的な還元反応を用いるリンタングステン酸比色法²⁾は特異性、感度ともに低いのでほとんど用いられていない。現在は、次式に示すように、酵素ウリカーゼを用いて尿酸を選択的に酸化して過酸化水素を生成させる方法が主流であり、この過酸化水素の検出法が多く検討されている。

なかでも、カタラーゼ存在下、過酸化水素によってアルコールを酸化し、呈色化学種に導くウリカーゼ・カタラーゼ法,⁸⁾ 及びペルオキシダーゼ (POD) の存在下にジエチルアニリンと 4-アミノアンチピリンの酸化縮合によって生成する色素を比色定量するウリカーゼ・ペルオキシダーゼ法⁴⁾が、キットも販売され広く用いられている。しかし、このウリカーゼ・カタラーゼ法及びウリカーゼ・ペルオキシダーゼ法は、いずれの場合も、過酸化水素による酸化反応に基づく呈色反応であり、酵素の水素供与体への基質特異性が低いために還元性共存物の影響を受け易いことが指摘されている。⁵⁾ また、血清尿酸は、汎用されている他の臨床検査項目であるグルコース、コレステロールなどと比較して、その存在量が少ない。しかも、臨床検査では、当然、試料の血清量が小さいことが望まれるが、このウリカーゼ・カタラーゼ法及びウリカーゼ・ペルオキシダーゼ法では、試料の微量化に十分な感度を持たない。したがって血清尿酸測定には、高い感度と精度を持ち、血清成分の巨大なマトリックスの影響を受け難い過酸化水素の検出法が望まれる。

我々は還元性共存物の影響を受け難い過酸化水素定量法として、吸光係数の大きい有機色素 (Y) を配位子とするチタン (IV) 錯体 (Ti-Y) を呈色試薬とし、ペルオキシチタン (IV) 錯体 {Ti(IV)-Y-H₂O₂} 生成に基づく吸光光度法を考案した。そしてこれまでに、Y としてピリジルアゾ化合物を用いた Ti-PAR 及び Ti-PAPS 試薬を提案した。^{6,7)} 最近、さらに試薬の高感度化を意図し、大きな吸光係数を持つポルフィリン化合物の 1 つである 5, 10, 15, 20-テトラ-4-ピリジル-ポルフィリン (TPyP) を Y とした Ti-TPyP 試薬による極微量過酸化水素の吸光光度定量法を報告した。⁸⁾ 本試薬では、過酸化水素 1 M 当たりの吸光度の変化量は、 $2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、ペルオキシダーゼ法の約 10 倍の感度を持ち、また、還元性共存物の影響も非常に小さい。本報では、この Ti-TPyP 試薬を用い、酵素ウリカーゼによって生じた過酸化水素を検出する血清中尿酸の定量法を確立した。

実 験 の 部

1. 試薬 Ti-TPyP 試薬 (50 μM): Oxo (5,10,15,20-tetra-4-pyridyl-porphyrinato)titanium (東京化成工業製) 34.3 mg を 0.05 M 塩酸に溶解し 1000 ml とした。

尿酸標準液 (1×10^{-2} M): 尿酸 (東京化成工業製) 168.11 mg を 1×10^{-2} M 炭酸リチウム溶液に溶解し 100 ml とした。

ウリカーゼ溶液 (0.05 U/ml): ウリカーゼ (EC 1.7.3.3, *Candida utilis* 由来, オリエンタル酵母工業製) を 0.05 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.2) に溶解した。

2. 測定方法 血清 5 μl に水 45 μl , ウリカーゼ溶液 200 μl を加えて混和し、室温で 5 分間放置して酵素反応を行わせる。次いで 3 M 硫酸及び Ti-TPyP 試薬を各々 250 μl 加えた後、45°C に 25 分間加温する。その後、水で全量 2.5 ml に希釈し、10 分間放置後、432 nm における吸光度 (A_s) を測定する。血清の代わりに、水を用いて同様に操作し、吸光度 (A_b) を測定する。両吸光度の差 ($\Delta A = A_b - A_s$) より尿酸濃度を求める。なお、吸光度測定時の対照には水を用いる。

結 果 及 び 考 察

1. 過酸化水素の呈色反応

オキソ(5,10,15,20-テトラ-4-ピリジル-ポルフィリン)チタン (IV) 錯体 {TiO(tpypH₄)⁴⁺} の酸性水溶液である Ti-TPyP 試薬は、ポルフィリンのソーレ帯と呼ばれる大きな吸収ピークを 432 nm に持つ。試薬に過酸化水素を加えた場合、次式に示すように、ペルオキソ(5,10,15,20-テトラ-4-ピリジル-ポルフィリン)チタン (IV) {TiO₂(tpypH₄)⁴⁺} を生成し、吸収ピークは 450 nm にシフトする。

したがって、432 nm における吸光度は減少し、450 nm における吸光度は増大する。この吸光度の減少及び増加量は、それぞれ加えた過酸化水素量に比例するので、いずれの吸光度変化量を測定しても過酸化水素を定量することができる。過酸化水素濃度に対する吸光度の変化量は 432 nm, 450 nm において、各々 $2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である。そこで本法では、より高感度な測定ができる 432 nm における吸光度の減少分 (ΔA) を測定した。

Ti-TPyP 試薬と過酸化水素の反応による $\text{TiO}_2(\text{tpypH}_4)^{4+}$ 錯体の生成反応は、酸によって促進される。⁸⁾ 前報では、1.6 M 過塩素酸中、常温で 5 分間の反応を行っている。しかし、この条件下では、血清を高率に希釈せずに過塩素酸を添加すると、タンパクの沈殿が生じる。そこで、今回、タンパク凝固作用のほとんどない硫酸を用いて液性調整をした。硫酸中における $\text{TiO}_2(\text{tpypH}_4)^{4+}$ 生成の反応条件を検討したところ、1.0 M の硫酸中で、45°C に 20 分以上加熱した場合に、最大かつ一定の ΔA が得られた。この場合、 ΔA が最大値に達するのに、20 分以上を必要とし、これは過塩素酸の場合に比較して約 4 倍であった。しかし、血清を高率に希釈せずともタンパク沈殿を生じないので遠心分離の必要がなく、かつ過酸化水素 1 M 当たりの ΔA は、 $2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、過塩素酸の場合より大きい値を示した。そこで、本法では、呈色体 $\text{TiO}_2(\text{tpypH}_4)^{4+}$ の生成反応は 1 M 硫酸中で、また吸光度測定は 0.3 M 硫酸中で行った。その他の過酸化水素の呈色反応条件は、前報と同じである。⁸⁾ 本法によって、過酸化水素 1×10^{-8} — $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ (25 pmol—5 nmol/test) の範囲で、検量線はよい直線性 ($r=0.999$) を示し、検出下限は $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ (吸光度測定時) であった。尿酸をウリカーゼの存在下酸化して、生成する過酸化水素をこの呈色反応によって検出した。

2. ウリカーゼによる反応の条件

ウリカーゼによる酵素反応諸条件が、呈色反応に与える影響を検討し、尿酸定量のための至適条件を定めた。

ウリカーゼ濃度を定めるために、血清の代わりに $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ 及び $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 尿酸標準液を用い、

Fig. 1. Effects of Uricase Concentration on ΔA
Concentration of uric acid in the final solution: ●, $1 \times 10^{-7} \text{ M}$; ■, $2 \times 10^{-7} \text{ M}$.

Fig. 2. The Time Course of the Formation of Hydrogen Peroxide Obtained Using Standard Uric Acid Solution in the Presence of Urucase
Concentration of uric acid in the final solution: ●, $1 \times 10^{-7} \text{ M}$; ■, $2 \times 10^{-7} \text{ M}$.
Concentration of uricase, 0.06 U/ml.

室温で5分間酵素反応を行った結果を Fig. 1 に示す。ウリカーゼ濃度を 0.0125—0.25 U/ml の範囲で変化させたところ、0.05 U/ml 以上で吸光度は最大かつ一定になったので、ウリカーゼの添加濃度を 0.06 U/ml に定めた。

次にウリカーゼ濃度を 0.06 U/ml とした場合の酵素反応時間を検討した (Fig. 2)。 1×10^{-4} M 尿酸標準液を用いた場合、室温で3分以上反応させると最大かつ一定の吸光度が得られ、9分においてもその値に変化は見られなかった。そこで酵素反応を十分に行わせることを考慮して、酵素反応時間を5分に定めた。ウリカーゼの至適 pH は、8.5 と報告されている。⁹⁾ しかし、今回用いたウリカーゼについて検討したところ、Fig. 3 に示すように pH 7.8—8.2 の間で最も高い吸光度が得られたので、酵素反応は、pH 8.2 のホウ酸緩衝液中で行った。

3. 検量線及び精度

実験の部の測定方法は、以上の検討結果に基づいて定めた。本法によって尿酸標準液を用いて得た検量線は、試料中尿酸を吸光度測定時の濃度で表した場合、 1×10^{-8} — 2×10^{-6} M の範囲で良好な直線性 (相関係数 $r=0.999$) が得られた。これは、血清試料中の尿酸濃度 5×10^{-6} — 1×10^{-3} M (0.08—16.8 mg/dl) に相当する。健常人の血清中尿酸値は、 1.8×10^{-4} — 4.6×10^{-4} M (2.5—7.7 mg/dl) と報告されている。^{1,10)} また、試料中尿酸濃度 3.77×10^{-4} M における繰返し定量値 ($n=8$) の相対標準偏差は、2.8% であり、測定値の信頼性は高いと考えられる。健常人及び、痛風のように尿酸含量が増大する病人の場合、血清試料 1—5 μ l で高い精度で測定でき、また健常人尿酸値の30分の1程度に減少する病態の場合でも、本法によって十分測定が可能である。尿酸 1 M に相当する ΔA は $2.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、過酸化水素のそれと比較すると、ウリカーゼによる尿酸の反応率は 96.5% と考えられる。

4. 共存物質の影響

本法の実際試料への応用に先立ち、共存物質が定量値に与える影響を検討した結果を Table I に示す。Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, NH₄⁺ 及び Cl⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻ などの無機イオンは尿酸の 1000 倍以上の存在でも、尿酸定量値に影響を与えなかった。したがって、血清中に含まれている濃度範囲ではこれらのイオンの存在は全く問題にならない。Cu²⁺, Fe³⁺ は、尿酸と同濃度以上では影響が見

Fig. 3. Effect of pH in the Enzymatic Oxidation with Uricase on ΔA

Concentration of uric acid in the final solution, 2×10^{-7} M.

Concentration of uricase, 0.06 U/ml.

TABLE I. Effects of Foreign Inorganic Substances on the Determination of Uric Acid by the Ti-TPyP Reagent

Substance	Conc. added in sample (M)	Uric acid found ^{a)} (%)
NaCl	5×10^{-2}	99.2
KCl	5×10^{-2}	100.0
CaCl ₂	5×10^{-2}	100.8
MgCl ₂	5×10^{-2}	100.0
NH ₄ Cl	5×10^{-2}	100.0
CuCl ₂	5×10^{-6}	98.3
FeCl ₃	5×10^{-6}	101.7
NaBr	5×10^{-2}	99.5
NaNO ₃	5×10^{-2}	99.7
Na ₂ CO ₃	5×10^{-4}	99.7
Na ₂ SO ₄	5×10^{-2}	99.3
NaH ₂ PO ₄	5×10^{-2}	99.5
H ₃ BO ₃	5×10^{-2}	100.1

a) Uric acid added, 5×10^{-5} M.

TABLE II. Effects of Foreign Organic Substances on the Determination of Uric Acid by the Ti-TPyP Reagent

Substance	Conc. added in sample (M)	Uric acid found ^{a)} (%)
Glycin	5×10^{-2}	99.1
Alanine	5×10^{-2}	99.1
Valine	5×10^{-2}	98.2
Leucine	5×10^{-2}	101.8
Isoleucine	5×10^{-2}	100.6
Serine	5×10^{-2}	100.8
Threonine	5×10^{-3}	101.1
Phenylalanine	5×10^{-2}	98.7
Tyrosine	5×10^{-3}	98.4
Tryptophan	5×10^{-3}	99.8
Aspartic acid	5×10^{-3}	98.7
Asparagine	5×10^{-2}	98.1
Glutamic acid	5×10^{-3}	100.0
Glutamine	5×10^{-2}	100.0
Lysine	5×10^{-2}	97.2
Histidine	5×10^{-2}	100.1
Cysteine	5×10^{-3}	97.2
Cystine	5×10^{-3}	98.9
Methionine	5×10^{-3}	99.2
Proline	5×10^{-2}	100.0
Ascorbic acid	5×10^{-5}	100.5

a) Uric acid added, 5×10^{-5} M.

られた。しかし、 Cu^{2+} , Fe^{3+} は生体内において、大部分がタンパクと結合しており、遊離状態での存在は極少量であると考えられ、実際に血清試料へ応用した場合、ほとんど影響は見られなかった。有機化合物の影響について検討した結

果を Table II に示す。システイン、アスコルビン酸以外各種アミノ酸では、尿酸の 1000 倍程度の存在でもほとんど影響がみられなかった。システインは、血清中に遊離状態での存在が報告されていない。また、アスコルビン酸については、実際試料では血清を 500 倍に希釈して呈色反応を行っているので、血清中アスコルビン酸濃度が 10^{-3} M 以上でなければ、実際試料への応用に際して問題とならないであろう。以上、各種化合物は血清中の存在量程度では、酵素、呈色反応ともに妨害せず、したがって特別な前処理を必要としないことを示している。

5. 血清中尿酸の定量

市販のコントロール血清など血清 4 検体について、血清中尿酸量を測定し、さらに血清中濃度 5×10^{-6} M に相当するように尿酸標準液を添加して回収率を求めた。それらの結果を Table III に示す。尿酸量は、コントロール血清の表示量 (SERACLEAR N; 2.4—3.5 mg/dl, SERACLEAR NA; 9.1—11.8 mg/dl) とほぼ一致し、添加回収値も 96.8—105.0% であり、ほぼ満足し得る結果が得られた。

21 種の血清について、本法によって得た尿酸値を、尿酸 B テストワコー {ウリカーゼ・3 メチル-N-エチル-N-(β-ヒドロキシエチル)-アニリン発色法, 和光純薬工業} による結果と比較した。Fig. 4 に示すように相関係数 $r=0.982$ であり、2 法の相関は高い。なお、この場合、血清使用量は本法で

TABLE III. Determination of Uric Acid in Serum by the Proposed Method

Serum	Conc. of uric acid in serum (mg/dl)	Recovery ^{a)} (%)
NESCOL X ^{b)}	2.11	101.4
NESCOL XA ^{c)}	8.97	105.0
SERACLEAR N ^{b)}	2.44	104.5
SERACLEAR NA ^{c)}	11.07	96.8

a) Uric acid added, 5×10^{-5} M. b) Normal serum. c) Abnormal serum.

Fig. 4. Correlation between Uric Acid Concentrations in Serum Samples Obtained by the Uricase-MEHA and Proposed Methods

は 5 μ l, キットは 50 μ l であった.

Ti-TPyP 試薬を用いる過酸化水素の定量系を, ウリカーゼによる尿酸の酸化反応と組み合わせ、血清尿酸の定量に応用した. ウリカーゼによる酵素反応は特異性が高いといわれており, また, 本呈色系は錯生成反応に基づいているので, 還元性共存物質の影響を受け難い. したがって, 本法によって, 巨大なマトリックス中の微量成分である血清中尿酸を, 高い選択性をもって定量することが可能であった. また, 本法は, 呈色反応時の過酸化水素濃度 1×10^{-8} M (25 pmol/test) まで検出が可能な感度を有するので, 血清 5 μ l を用いて高精度な尿酸測定ができる. 一方, 従来法であるウリカーゼ・ペルオキシダーゼ法は, 本法の約 10 倍以上の血清試料を必要とする. また最近報告されている化学発光法は, 感度は高い (血清必要量 10 μ l 程度) が, 特殊な測定器を必要とし, また共存物質の影響を受けやすい.¹¹⁾ 一方, 本法はどこにでもある吸光光度計を用いて高感度な定量が可能である.

極めて高感度な過酸化水素呈色試薬である Ti-TPyP 試薬は, さらに各種の酸化酵素と組み合わせることによって, 多くの極微量生体成分分析への応用が可能であろう.

引用文献

- 1) 西岡久寿樹, 日本臨床, **47** (1989 年増刊号), 410 (1989).
- 2) J. J. Carrol, H. Coburn, R. Douglass, A. L. Babson, *Clin. Chem.*, **17**, 158 (1971).
- 3) N. Kageyama, *Clin. Chim. Acta*, **31**, 421 (1971).
- 4) S. Meites, C. Thompson, R. W. Roach, K. Sanieel-Banrey, *Clin. Chem.*, **19**, 675 (1973).
- 5) 松本宏治郎, 溝口香代子, 菅野剛史, 臨床化学, **8**, 63 (1979).
- 6) 松原チヨ, 高村喜代子, 分析化学, **29**, 759 (1980).
- 7) C. Matsubara, K. Kudo, T. Kawashita, K. Takamura, *Anal. Chem.*, **57**, 1107 (1985).
- 8) C. Matsubara, N. Kawamoto, K. Takamura, *Analyst*, **117**, 1781 (1992).
- 9) 馬場茂明, 和田 博, 北村元仕, 奥田 潤 (編), “臨床酵素ハンドブック,” 第 1 版, 講談社, 東京, 1982, p. 462.
- 10) 林 康之, 玄番昭夫, “正常値ガイドブック—その臨床応用—,” 宇宙堂八木書店, 東京, 1986, p. 225.
- 11) H. Watanabe, N. Mitsuhida, M. Andoh, M. Takeda, M. Maeda, A. Tsuji, *Anal. Sci.*, **2**, 461 (1986).