

チタン(IV)-ポルフィリン錯体試薬を用いる血清中及び尿中グルコースの吸光光度定量

松原 チヨ[®], 河本 直樹, 高村喜代子*

(1991年12月12日受理)

Ti(IV)-5,10,15,20-テトラ(4-ピリジル)ポルフィン $\{\text{TiO}(\text{tpypH}_4)^{4+}\}$ の強酸性溶液 (Ti-TPyP 試薬) を H_2O_2 溶液に加えると, $\text{TiO}_2(\text{tpypH}_4)^{4+}$ 錯体が生成し, $\text{TiO}(\text{tpypH}_4)^{4+}$ 錯体は減少するので, その吸光度 (λ_{max} : 432 nm) は減少する. 吸光度の減少分 $\Delta\text{Absorbance}$ は H_2O_2 濃度に比例するので, この値を測定することにより H_2O_2 を定量でき, H_2O_2 1 M 当たりの $\Delta\text{Absorbance}$ は 1.9×10^5 であった. この反応はペルオキシ錯体生成反応に基づいているので, 還元性共存物質による影響を受け難い. 本反応を, グルコースオキシダーゼによる H_2O_2 生成反応と組み合わせて, 血清及び尿中グルコースの定量に応用した. 血清中で 64.8~249.1 mg/dl, 尿中で 6.54~90.8 mg/dl の定量値が得られ, 血清への 180.2 mg/dl のグルコースの添加回収率は 98.0~105.3% であった.

1 緒 言

血清中グルコースは臨床化学の分野で最も多く用いられている測定項目の一つであるので, 高い感度, 精度をもつ測定法を開発し, 血清試料の少量化を図ることは有意義である.

現在, 血清中グルコースの測定には, グルコースオキシダーゼ (GOD) とペルオキシダーゼ (POD) を用い, グルコースの酸化で生じた過酸化水素によって色原体を酸化する Trinder の方法¹⁾, あるいはその改良法²⁾³⁾が多く用いられている. しかし, これらの方法に共通する問題点として, POD の基質特異性が低いために, 共存する還元性物質によって負誤差を生じやすく, 感度も試料の微量化を図るには不十分であることが挙げられる. GOD による酵素反応と酸素電極⁴⁾⁵⁾あるいは過酸化水素電極⁶⁾⁷⁾を組み合わせた酵素電極法も近年用いられてきたが, 感度が十分でなく, 又, 電極表面にタンパク質が吸着するために電極の使用寿命が短いなど, 幾つかの問題点が指摘されている.

著者らは以前から, 高い感度と精度をもち, かつ選択性の高い過酸化水素測定法として, 色素を配位子とするチタン(IV)錯体を試薬とするペルオキシ錯体生成に基づく吸光光度法を提案してきた⁸⁾⁹⁾. 又最近, 更に高感度化を意図して, 吸光係数の大きい Ti(IV)-5,10,15,

20-テトラ(4-ピリジル)ポルフィン錯体 $\{\text{TiO}(\text{tpypH}_4)^{4+}\}$ を試薬 (Ti-TPyP 試薬) とする極微量過酸化水素の吸光光度定量法を考案した¹⁰⁾. 本報では, Ti-TPyP 試薬の生体関連物質定量への応用を図り, 酵素 GOD と組み合わせて, 試料の微量化が求められている血清中グルコース及び尿中グルコースの定量法を確立した.

2 実 験

2.1 試 薬

TiO(tpyp) 錯体は田中らの方法¹¹⁾に従って合成した. Ti-TPyP 試薬 (50 μM): TiO(tpyp) 錯体 34.03 mg を 0.05 M 塩酸に溶解して 1000 ml とした. 本試薬は, 室温で 6 か月, 冷暗所で 18 か月以上の保存が可能であった. グルコース標準液 (10.0 mM): D-グルコース (試薬特級, 和光純薬工業) 1.802 g を取り, 水に溶解して全量 1000 ml とした. この溶液は使用時に水で適宜希釈した. グルコースオキシダーゼ (GOD) 溶液 (7.5 U/ml): グルコースオキシダーゼ (EC 1.1.3.4, *Aspergillus niger* 由来, Sigma) を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解した. 溶液の酵素活性は, 冷蔵保存の場合は 1 週間以内では変化が認められなかった.

2.2 定量操作

血清の場合は 200 倍に, 尿では 50 倍に希釈して検液とし, その 50 μl (グルコース 50 pmol~8 nmol を含

* 東京薬科大学薬学部: 192-03 東京都八王子市堀之内 1432-1

む)を取る。GOD 溶液 200 μl を加えて 45°C で 15 分間加温する。次いで、4.8 M 過塩素酸及び Ti-TPyP 試薬を各々 250 μl 加えて室温で 5 分間放置する。その後、水で全量 2.5 ml として、432 nm における吸光度 (A_s) を測定する。検液の代わりに水 50 μl を取って同様に操作し、吸光度 (A_b) を測定する。両吸光度の差 ($\Delta\text{Absorbance} = A_b - A_s$) より、グルコース濃度を求める。

3 結果及び考察

3.1 定量条件の検討

3.1.1 呈色反応 過酸化水素は酸性条件下、 $\text{TiO}(\text{tpypH}_4)^{4+}$ 錯体 (λ_{max} : 432 nm) と反応して $\text{TiO}_2(\text{tpypH}_4)^{4+}$ 錯体 (λ_{max} : 442 nm) を生成する。そのときの吸収スペクトル変化を Fig. 1 に示す。



従って、Ti-TPyP 試薬に過酸化水素を加えた場合、432 nm における吸光度は減少し、442 nm の吸光度は増大する。この吸光度の増加及び減少量はそれぞれ加えた過酸化水素量に比例するので、この吸光度変化を測定して、過酸化水素を定量することができる。ところで、過酸化水素 1 M に対する吸光度変化量は、432 nm では

1.9×10^5 , 442 nm では 1.1×10^5 である。そこで本報では、約 2 倍高感度な測定ができる 432 nm において、吸光度の減少分 ($\Delta\text{Absorbance}$) を測定した。

このペルオキシ錯体形成反応は、プロトンによって加速され、 $[\text{H}^+] = 1.6 \text{ M}$ 以上においては、5 分後にほぼ反応は完結する。一方、 $\text{TiO}(\text{tpypH}_4)^{4+}$ の見掛けのモル吸光係数は、 $[\text{H}^+] = 0.1 \text{ mM} \sim 0.5 \text{ M}$ のとき最大となる。従って、速やかに反応を進めるために、錯形成反応時は 1.6 M 過塩素酸中で行ったうえで、吸光度測定時には高い感度が得られる酸濃度の上限 (0.5 M) になるように水で希釈した。

反応時の温度、時間の影響を検討したところ、温度 15~55°C の範囲で、5 分後に最大かつ一定の $\Delta\text{Absorbance}$ が得られたので、試薬添加後、室温で 5 分間放置してから測定することとした。

以上の検討結果に基づいて、過酸化水素の定量操作を、前述のように定めた。

3.1.2 GOD の反応条件 GOD 濃度については、既報の結果⁹⁾を参考にして定めた。

GOD の至適 pH は一般には pH 5.6 とされているが、pH 6.5 という報告もある¹²⁾。そこで、本報で用いた GOD について検討したところ、Fig. 2 に示すように pH 6.5 において最も高い $\Delta\text{Absorbance}$ が得られ

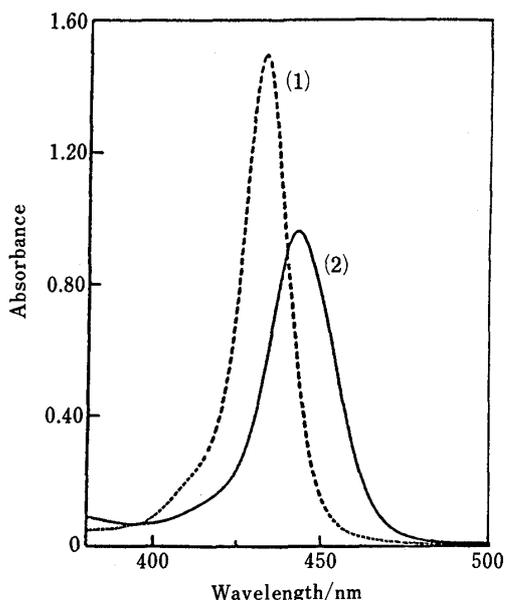


Fig. 1 Absorption spectra of (1) the Ti-TPyP reagent and (2) $\text{TiO}_2(\text{tpypH}_4)^{4+}$ complex in 0.5 M perchloric acid solution

Concentration of Ti-TPyP: $5 \times 10^{-6} \text{ M}$; Concentration of H_2O_2 : (1) 0 M, (2) $1 \times 10^{-5} \text{ M}$

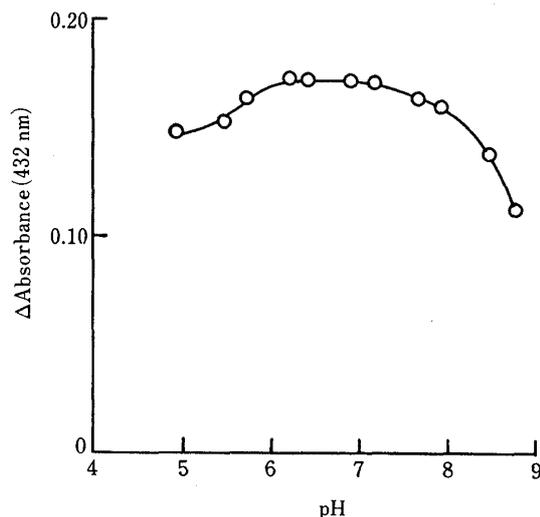


Fig. 2 pH dependence of $\Delta\text{Absorbance}$ due to the formation of hydrogen peroxide from glucose by glucose oxidase at 45°C in 0.05 M acetate buffer (pH 5.0, 5.8), 0.05 M phosphate buffer (pH 6.3 to 8.0) and 0.05 M borate buffer (pH 8.5, 8.8)

Concentration of glucose oxidase: 2.5 U/ml in the reaction mixture; Concentration of glucose: $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ in the final solution

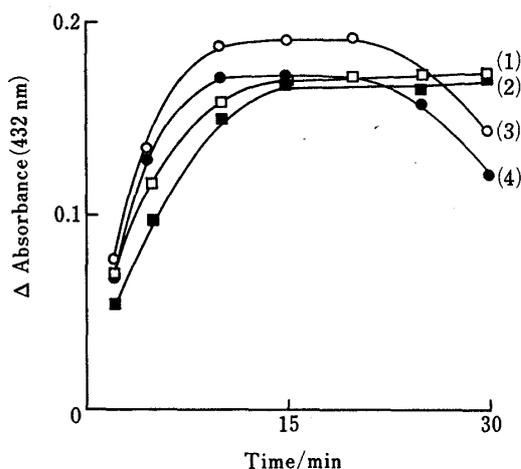


Fig. 3 Time course of the formation of hydrogen peroxide obtained with (1) and (3), glucose standard solution and (2) and (4), serum

Temperature: (1) and (2), 37°C and (3) and (4), 45°C; Concentration of glucose oxidase: 2.5 U/ml in the reaction mixture; Concentration of glucose: 1×10^{-6} M in the final solution

た。そこで、酵素反応では、pH 6.5 のリン酸緩衝液 (0.05 M) を用いた。

酵素反応時の反応温度及び時間を検討した結果を、Fig. 3 に示す。37°C では、15 分間でグルコースの約 90% が反応したが、それ以上時間経過しても、ほとんど吸光度変化は見られなかった。一方、45°C では、約 10 分後にはほぼ定量的に酸化反応が終了し、その後 10 分間は、吸光度に変化が見られなかった。従って、本法では、45°C で 15 分間反応を行うこととした。

以上の結果に基づいて酵素反応条件を、定量操作の項に示すように定めた。

3・2 検量線及び精度

本法によって得た検量線は、20 nM~3.2 μM (50 pmol~8 nmol/test) の範囲で良い直線性 (相関係数 $r=0.999$) を示し、グルコース 1 M に対する Δ Absorbance は、 1.8×10^5 であった。又、吸光度測定時 1 μM の試料における定量値の相対標準偏差は 1.4% ($n=8$) であった。

3・3 共存物質の影響

実際試料への応用に先立ち、血中、尿中に予想される共存物質の定量値に対する影響を検討した。Table 1 に示すように Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- など、生体内に多量に存在する無機イオンは、血清あるいは尿中の存在量

Table 1 Effects of foreign inorganic substances on the determination of glucose by the use of GOD and the Ti-TPyP reagent

Substance	Concn. /M	Glucose [†] found, %
NaCl	1×10^{-3}	100.0
KCl	1×10^{-3}	101.4
CaCl ₂	1×10^{-3}	98.6
MgCl ₂	1×10^{-3}	97.2
NH ₄ Cl	1×10^{-3}	100.0
CuCl ₂	1×10^{-4}	94.4
FeCl ₃	1×10^{-5}	97.3
NaBr	1×10^{-3}	97.2
NaNO ₃	1×10^{-3}	98.6
Na ₂ CO ₃	1×10^{-3}	100.0
Na ₂ SO ₄	1×10^{-3}	101.4
NaH ₂ PO ₄	1×10^{-3}	100.6
H ₃ BO ₃	1×10^{-3}	99.6

[†] [glucose]: 1.00×10^{-6} M

Table 2 Effects of foreign organic substances on the determination of glucose by the Ti-TPyP reagent

Substance	Concn. /M	Glucose [†] found, %
Glycine	1×10^{-3}	101.9
Alanine	1×10^{-3}	98.1
Valine	1×10^{-3}	99.0
Leucine	1×10^{-3}	97.5
Isoleucine	1×10^{-3}	101.3
Serine	1×10^{-4}	102.9
Threonine	1×10^{-3}	99.6
Phenylalanine	1×10^{-3}	97.5
Tyrosine	1×10^{-4}	98.0
Tryptophan	1×10^{-4}	102.4
Ascorbic acid	1×10^{-7}	97.7
Aspartic acid	1×10^{-3}	101.5
Asparagine	1×10^{-3}	101.5
Glutamic acid	1×10^{-3}	100.4
Glutamine	1×10^{-3}	100.4
Lysine	1×10^{-3}	98.5
Histidine	1×10^{-4}	100.3
Cysteine	1×10^{-6}	99.8
Cystine	1×10^{-4}	98.7
Methionine	1×10^{-6}	97.8
Proline	1×10^{-3}	101.5

[†] [glucose]: 1.00×10^{-6} M

程度では影響が見られなかった。又、血清中の微量金属イオンである Fe^{3+} , Cu^{2+} は、それぞれグルコースの 10 倍、100 倍濃度の存在でも影響を与えなかった。グ

リシン, グルタミン酸, リジンなどの多くのアミノ酸はグルコースの 1000 倍の濃度で共存しても影響しなかった (Table 2). システイン及びメチオニンはグルコースと等量まで, 又, アスコルビン酸はその 1/10 倍の濃度までしか共存を許されない. しかし, 血清中のシステインの存在は報告されておらず, 又, メチオニン及びアスコルビン酸の血清中濃度はそれぞれグルコースの約 1/120 及び 1/100 程度であるので¹³⁾, 実試料への応用に際しては問題とならない.

3・4 血清中グルコースの定量

本定量法を用いてヒト血清中グルコースを測定した. 血糖はそのままでは濃度が高すぎて測定できないので, 血清 1 μ l をとって 200 μ l に希釈して検液とした. 市販のプール血清及びコントロール血清についてグルコース濃度を求め, 更に, 両者へのグルコースの添加回収実験を行い, 本法の信頼性を確かめた (Table 3). 正常域, 異常域, どちらの血清においても, 添加回収値は 98% 以上のほぼ満足し得る結果が得られた. 異常域の血清には, グルコースをはじめ, 30 種以上の成分が病態時のレベルで含まれているが, その影響がほとんど見られなかった. 従って本法によれば病態時の血清中グルコースの定量においても, なんら前処理をすることなく測定することが可能である.

20 種の血清についてグルコースを定量し, グルコース B テストワコー (POD-4-アミノアンチピリン-フェノール法, 和光純薬工業) による結果と比較した. Fig. 4 に示したように相関係数 $r=0.963$, 回帰直線 $y=0.980x-1.07$ mg/dl (y が本法) が得られた. この相関性は, 必ずしも十分とは言えず, 試料によっては, POD-4-アミノアンチピリン-フェノール法とは異なる値が得られ, 試料に含まれている共存成分による影響がそれぞれの方法で異なる場合があることを示している. このことは, 今後更に検討を必要とするであろう.

Table 3 Determination of glucose in serum

Serum	Concn./ mg dl ⁻¹	Recovery, % ^{a)}
NESCOL X ^{b)}	110.0	Av. ^{d)} 98.4
NESCOL XA ^{c)}	249.1	105.3
SERACLEAR N ^{b)}	119.2	98.9
SERACLEAR NA ^{c)}	166.4	98.0

a) glucose added: 180.2 mg dl⁻¹, b) normal serum;
c) abnormal serum; d) $n=3$

3・5 尿中グルコースの定量

尿中のグルコースは血清中のそれより希薄であり, 健常人の場合は従来法での検出は難しく, 臨床分析分野ではこれまでに, 定量が行われていない. そこで, 高い感度を有する本法によって尿中のグルコース定量を試みた. この際, 非健常人では定量上限を超える可能性があるため, 尿を 50 倍に希釈して検体とした.

ヒト尿 4 試料について測定した結果, 6.54~90.8 mg/dl のグルコースが検出された (Table 4). 尿中の糖はこのように希薄であり, 他法による測定は困難であるので, 本法の信頼性を確かめるため, 添加回収実験を行った. それぞれの試料に, 18.02 mg/dl 相当のグルコースを添加したところ, 回収率は 95.8~102.6% であった. 以上, 本法によって, 尿中のグルコースのように, 非常に希薄な状態で存在するグルコースをも簡便に測定することができた.

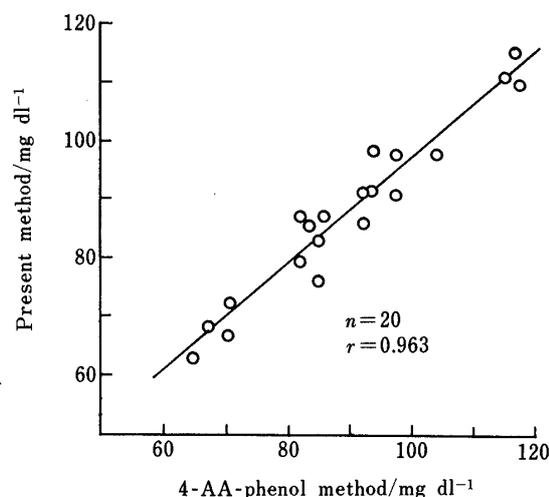


Fig. 4 Correlation between the results obtained by the glucose oxidase-4-aminoantipyrine-phenol method and the proposed method

Table 4 Determination of glucose in urine

Urine sample	Concn./ mg dl ⁻¹	Recovery, % ^{a)}
No. 1	6.54	Av. ^{b)} 102.6
No. 2	12.8	100.3
No. 3	10.8	97.5
No. 4	90.8	95.8

a) glucose added: 18.02 mg dl⁻¹; b) $n=3$

以上, Ti-TPyP 試薬を用いる過酸化水素の定量系と, GOD によるグルコースの酸化反応を組み合わせ、血清及び尿中グルコースの測定に応用した。GOD の酵素反応は特異性が高いと言われ、又、本呈色系は共存物質の妨害を受け難いので、本法によって選択性の高い分析が可能である。更に、本法の感度が高いことから、血清中グルコースは $1 \mu\text{l}$ の血清で測定でき、又、尿のように希薄な試料においても、濃縮などの前処理なしに精度の高いグルコース定量が可能であった。

本法は検出限界が 20 nM (50 pmol/test) であり、高い感度と精度を有している。それぞれの酸化酵素と組み合わせることによって、種々の生体成分の分析に応用が可能であろう。

TiO(tpyp) 錯体の合成は、東京化成工業の御助力によった。ここに記して感謝する。

(1991年3月, 日本薬学会第111)
年会において一部発表

文 献

- 1) P. Trinder: *Ann. Clin. Biochem.*, **6**, 24 (1969).
- 2) N. Gochman, J. M. Schmitz: *Clin. Chem.*, **18**, 943 (1972).
- 3) L. G. Morin and J. Prox: *Clin. Chem.*, **19**, 959 (1973).
- 4) S. J. Updike, G. P. Hicks: *Nature (London)*, **214**, 986 (1967).
- 5) J. Okuda, G. Okuda: *Clin. Chim. Acta*, **23**, 365 (1969).
- 6) L. C. Clark, C. Lyons: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **102**, 29 (1962).
- 7) 相澤益男, 千葉恒雄, 篠原寛明: 日化, **1987**, 2210 (1987).
- 8) 松原チヨ, 高村喜代子: 分析化学, **29**, 759 (1980).
- 9) C. Matsubara, K. Kudo, T. Kawashita, K. Takamura: *Anal. Chem.*, **57**, 1107 (1985).
- 10) 松原チヨ, 河本直樹, 高村喜代子: 日本分析化学会第39年会講演要旨集, p. 215 (1990).
- 11) M. Inamo, S. Funahashi, M. Tanaka: *Inorg. Chem.*, **24**, 3734 (1983).
- 12) J. Keeseey: "Biochemica Information", 1st Ed., p. 27 (1987), (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis).
- 13) 北村元仕, 塚田理康, 長野 弘: "生化学データブック I", 日本生化学会編, p. 1548 (1979), (東京化学同人).



Spectrophotometric determination of glucose in serum and urine using titanium(IV)-porphyrin complex. Chiyo MATSUBARA, Naoki KAWAMOTO and Kiyoko TAKAMURA (Tokyo College of Pharmacy, 1432-1, Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo 192-03)

[5,10,15,20-Tetra(4-pyridyl)porphinato]oxotitanium(IV) {denoted as $\text{TiO}(\text{tpypH}_4)^{4+}$, (λ_{max} : 432 nm)} reacts with hydrogen peroxide to form a mono-peroxo complex, resulting in a significant decrease of the absorbance at 432 nm. The degree of the absorbance change (Δ Absorbance) was found to be proportional to the concentration of added hydrogen peroxide. This fact was successfully applied to the determination of the glucose in serum and urine by the use of glucose oxidase. A linear relation was obtained between Δ Absorbance and glucose concentration ranging from 20 nM to $3.2 \mu\text{M}$ ($r=0.999$). The apparent molar absorptivity of glucose was $1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The relative standard deviation of repeated runs ($1 \mu\text{M}$, $n=8$) was 1.4%. With only $1 \mu\text{l}$ serum, the content of glucose ranging from 64.8 to 249.1 mg/dl in concentration could be determined. The recovery of glucose (180.2 mg/dl) added to serum was 98.0 to 105.3%. No preconcentration was required to determine glucose in urine (6.54~90.8 mg/dl) by the present method because of its high sensitivity for hydrogen peroxide.

(Received December 12, 1991)

Keyword phrases

spectrophotometry of trace hydrogen peroxide; [5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphinato]oxotitanium(IV) complex; [5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphinato]peroxotitanium(IV) complex; assay of glucose.