

## 報 文

## 電気化学検出高速液体クロマトグラフィーによる血中乳酸の定量

宮口 裕二\*, 小 谷 明\*, 楠 文 代®\*

Determination of lactic acid in human plasma by HPLC with  
electrochemical detection

Yuji MIYAGUCHI, Akira KOTANI and Fumiyo KUSU\*

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

(Received 27 April 2002, Accepted 26 July 2002)

High-performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD) based on the reduction reaction of quinone was used to determine lactic acid in human blood. The peak area of the current signal (charge) was proportional to the amount of lactic acid, ranging from 0.1 nmol to 40 nmol ( $r > 0.999$ ). Standard lactic acid at 10 nmol was determined ten times with a relative standard deviation (RSD) of 1.18%. The detection limit ( $S/N = 3$ ) was 0.04 nmol. The concentration of lactic acid in plasma collected from a volunteer after 14 hours of fasting and 1 hour after eating a meal obtained by the present method were 1.26 mM and 2.32 mM, respectively. The RSD ( $n = 5$ ) was 3.6% or less and the recovery was 94% or more. The concentrations were identical with those obtained by a commercial lactic acid determination kit (F-kit, DL-lactic acid), which a required ten-times larger sample volume than that for the present method. The present method is useful for analyzing of the lactic acid for studying the circulatory system and a metabolism system.

**Keywords :** HPLC-ECD; quinone; determination; lactic acid in human plasma.

## 1 緒 言

乳酸は、血中において一価の陰イオンの有機酸として存在し、主に骨格筋や赤血球、脳、皮膚、腸管でピルビン酸から乳酸脱水素酵素 (LDH) の作用によって、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) により還元されて産生される<sup>1)</sup>。このため、血中の乳酸濃度は、生体の酸化還元状態を反映していると考えられており、循環不全やI型糖原病などの病態や運動負荷によって高値を示す<sup>2)</sup>。また、種々の酵素欠損症では低い値となり、循環系・代謝系の異常や、運動強度の指標となる。

血液中の乳酸の測定法は、酵素を用いた方法が一般的であり、LDHによって生じたNADHの量を測定するUV法のほか、乳酸オキシダーゼ (LOD) とペルオキシダーゼ

(POD) を用いる比色法、小型センサーとして用いられている酵素電極法などがある<sup>3)~5)</sup>。

1968年に高村らは、ポーラログラフィーによるキノンの電解還元時に、微量酸の共存によって還元前置波が生じることを見だし、その電流測定で微量酸定量への応用が示された<sup>6)</sup>。1994年楠らによって、高級脂肪酸の高感度定量にグラシーカーボン電極を用いたボルタンメトリーが有用であることが見いだされ<sup>7)</sup>、その後、キノンの電解還元反応を利用した酸測定法が開発されてきている<sup>8)</sup>。中でも、この原理を応用した電気化学検出高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) では、酸に対する特異性によって、従来の紫外可視吸光 HPLC (HPLC-UV) に比べて、誘導体化などの測定試料の前処理時間を大幅に軽減できるという利点があり、既にこの方法を用いて血中の遊離脂肪酸の分離定量を可能とした<sup>9)</sup>。本研究では、血液中の乳酸の定量のために、比較的簡便な前処理で測定できる迅速な方法を

\* 東京薬科大学薬学部: 192-0392 東京都八王子市堀之内  
1432-1

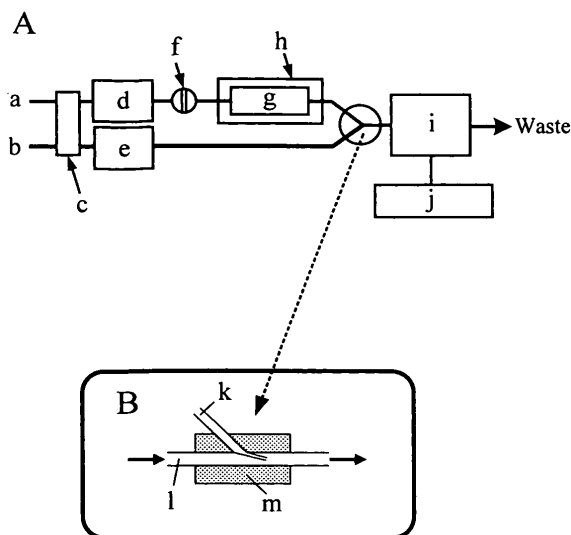


Fig. 1 HPLC-ECD system

(A) Block diagram of the HPLC-ECD system and (B) Mixer; (a) mobile phase, 0.1 mM  $\text{HClO}_4$ ; (b) quinone solution, ethanol containing 6 mM  $\text{VK}_3$  and 76 mM  $\text{LiClO}_4$ ; (c) degasser; (d) pump1 (flow rate,  $1.0 \text{ ml min}^{-1}$ ); (e) pump2 (flow rate,  $1.0 \text{ ml min}^{-1}$ ); (f) sample injector; (g) column; (h) column oven; (i) electrochemical detector (working electrode, glassy carbon; reference electrode, SCE; counter electrode, stainless steel); (j) recorder; (k) polytetrafluoroethylene tube (i.d. 0.5 mm); (l) polytetrafluoroethylene tube (i.d. 1.0 mm); (m) resin

確立した。

## 2 実験

### 2.1 試薬類

移動相には過塩素酸 (精密分析用), キノン溶液には 2-メチル-1,4-ナフトキノン (ビタミン  $\text{K}_3$ ,  $\text{VK}_3$ ) (特級), 過塩素酸リチウム (特級) とエタノール (特級) を用いた。酸標準品には乳酸 (特級) を, 内標準物質は 3-メチルグルタル酸 (以上, 和光純薬製) を用いた。また, HPLC-ECD の測定結果の比較対象として, 市販の乳酸測定キット (F-キット DL-乳酸, ロシュ・ダイアグノティックス製) を使用した。

### 2.2 HPLC-ECD システム及び測定条件

HPLC-ECD の概略を Fig. 1, A に示す。ポンプ (PU-980, 日本分光製) を 2 台用いた 2 流路系とし, ほかにデガッサー (DG-980-50, 同社製), サンプルインジェクター (model 7125, Reodyne 製), ダンパー (HPD-1, ジーエルサイエンス製), ポテンシオスタット (HECS 311B, 扶桑製作所製), レコーダー (807-IT, 日本分光製) を使用し, 電気化学セル (EC-840, 同社製) には, 作用電極にグラシーカーボン, 参照電極に飽和カロメル電極 (SCE),

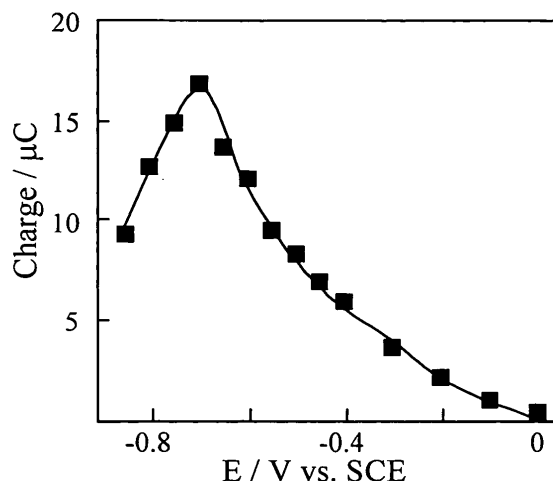


Fig. 2 Charge-potential curve of lactic acid

Conditions: spiked amount of lactic acid, 20 nmol; mobile phase, 0.1 mM  $\text{HClO}_4$ ; quinone solution, 6 mM  $\text{VK}_3$  and 76 mM  $\text{LiClO}_4$ ; column, Shodex Rspak KC-811; flow rate,  $1.0 \text{ ml min}^{-1}$

対極電極にステンレス鋼の三電極式のセルを用いた。カラムはイオン排除型カラム (Shim-pack SPR-H 250  $\text{mm} \times 7.8 \text{ mm i.d.}$  島津製, Shodex Rspak KC-811, 300  $\text{mm} \times 8 \text{ mm i.d.}$  昭和電工製) とガードカラム (KC-G, 50  $\text{mm} \times 6 \text{ mm i.d.}$  同社製) を用い, カラムオープン (CO-965, 日本分光製) 内に設置した。ミキシング部の概形を Fig. 1, B に示した。ポリテトラフルオロエチレンチューブ (1.0 mm i.d.) の側面に穴を開け, 0.5 mm i.d. のチューブを挿入し, エポキシ樹脂で固めて作製した。

移動相には, 0.1 mM  $\text{HClO}_4$  を用い, キノン溶液は  $\text{VK}_3$  を 6 mM,  $\text{LiClO}_4$  は 76 mM となるようエタノールに溶解して調製し, 遮光して使用した。カラム温度は  $45^\circ\text{C}$ , 流量はともに  $1.0 \text{ ml min}^{-1}$  とした。試料の注入量は  $20 \mu\text{l}$  であり, 測定電位は  $-0.7 \text{ V vs. SCE}$  とした。

### 2.3 採血と試料溶液の調製

血液は 14 時間絶食した 23 歳男性から採取し, 食後 1 時間において再び採血した。血しょうを分取し, それを 0.5 mM 3-メチルグルタル酸を含む 0.1 mM 過塩素酸水溶液で 5 倍に希釈して測定溶液とし, その  $20 \mu\text{l}$  を HPLC 測定装置に注入した。

## 3 結果と考察

### 3.1 HPLC-ECD による乳酸の定量

**3.1.1 測定条件の検討** 最適な印加電位を決定するため, 乳酸 20 nmol の標準溶液について  $0.00 \sim -0.85 \text{ V vs. SCE}$  の検出電位においてクロマトグラムを測定し, 電位-電流量曲線を作成した。Fig. 2 に示すように,  $-0.7 \text{ V vs. SCE}$  のときに最大の電流量が得られ,  $S/N$  も最も大で

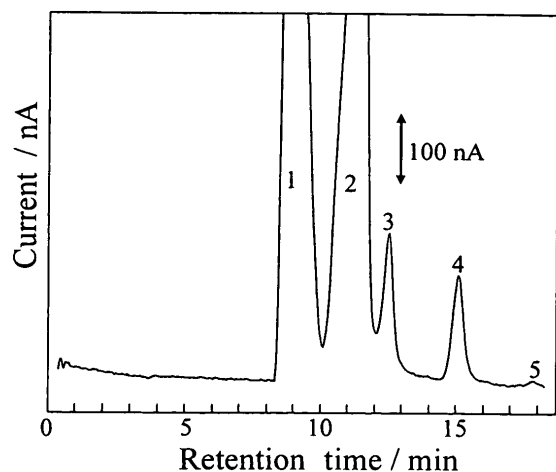


Fig. 3 Chromatogram of acid in human plasma with NaF

HPLC conditions: column, Shim-pack SPR-H and Shodex Rspak KC-811; applied potential,  $-0.7\text{ V vs. SCE}$ ; other conditions are same as in Fig. 2. Peaks: 1, HCl, phosphoric acid and pyruvic acid etc.; 2, HF; 3, lactic acid; 4, 3-methylglutaric acid (Internal standard); 5, acetic acid.

あったため、測定電位とした。

**3・1・2 定量範囲と再現性** カラムには Shim-pack SPR-H を用い、乳酸を移動相で希釈して測定溶液とし、その  $20\text{ }\mu\text{l}$  を注入して  $-0.7\text{ V vs. SCE}$  の電位で測定した。本法では、クロマトグラムの保持時間は  $5.5\text{ 分}$  であり、約  $8\text{ 分}$  で測定を行うことができた。得られた電流量は乳酸  $0.1\sim 40\text{ nmol}$  の範囲で相関係数  $0.999$  以上の良好な直線関係を示し、検出限界は  $0.04\text{ nmol}$  ( $S/N=3$ ), 相対標準偏差 (RSD) は  $1.18\%$  ( $10\text{ nmol}$ , 乳酸,  $n=10$ ) であった。

**3・1・3 フッ化ナトリウムの影響** 通常、赤血球中の酵素によって糖が代謝され、乳酸濃度が増してしまうため、解糖阻止剤としてフッ化ナトリウム (NaF) などが用いられる。ヘパリンと NaF をあらかじめ加えた採血管に全血を採取し、上述した方法で調製した試料溶液についてカラムを 1 本にして測定したところ、乳酸の十分な分離が得られなかった。そこで Shim-pack SPR-H と Rspak KC-811 の 2 本のカラムを用いて測定を行い、Fig. 3 に示すクロマトグラムが得られた。クロマトグラムのピーク 1 は塩酸やリン酸・ピルビン酸など、ピーク 2 はフッ酸、ピーク 3 は乳酸であった。また、保持時間約  $18\text{ 分}$  の位置に酢酸が検出された。カラムを Shim-pack SPR-H 1 本のみとした場合、乳酸のピークが NaF に基因するフッ酸と重なり測定できなくなる。そのため解糖阻止剤を加えずに試料溶液を調製し、より迅速な測定を行うこととした。

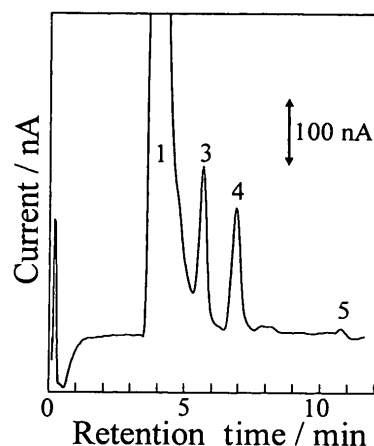


Fig. 4 Chromatogram of acid in human plasma

HPLC conditions: column, Shim-pack SPR-H; Other conditions are same as in Fig. 3. Peaks: 1, HCl, phosphoric acid and pyruvic acid etc.; 3, lactic acid; 4, 3-methylglutaric acid (Internal standard); 5, acetic acid.

### 3・2 血しょう中乳酸の測定

NaF を用いず、カラムは Shim-pack SPR-H のみの条件で測定したクロマトグラムを Fig. 4 に示した。この場合、乳酸の保持時間は約  $5.5\text{ 分}$ 、内標準物質が約  $7\text{ 分}$  となり、採血から  $10\text{ 分}$  以内で測定を行うことが可能であった。本実験では、 $23$  歳男性の空腹時 ( $14$  時間絶食) 及び食後  $1$  時間の血液を採取し、測定を行った。乳酸濃度は空腹時で約  $1\text{ mM}$ 、食後では約  $2\text{ mM}$  となり、食事による約  $2$  倍の乳酸値の上昇が確認できた。分離した血しょうから  $5$  個の試料溶液を調製し、それぞれ測定したところ、RSD は  $3.6\%$  以下であった。また、同じ血しょうについて、別に  $5$  個の試料溶液に対して添加回収試験を行った結果、回収率は空腹時で  $98.7\%$ 、食事後で  $94\%$  という良好な結果が得られた。また、除タンパク処理を行う市販の乳酸測定キット (F-キット DL-乳酸) と比較した。本法で測定に必要な血しょうの量は F-キットに比べ  $10\text{ 分}$  の  $1$  以下であった。測定値は、両者がよく一致した結果が得られた。解糖阻止剤を使用しないことが、乳酸の測定に影響するか否かを検討した。Table 1 には、NaF を加えた血しょうについて測定した結果も示した。この場合も、本法と F-キットの測定値はほぼ一致した。このため、NaF を使用しないことによる乳酸測定値への影響は無視できると考えられる。

## 4 結 論

キノンの電解還元反応を利用した HPLC-ECD により、血液中の乳酸を定量することができた。血しょうを希釈するだけの簡単な前処理法で測定可能であり、測定時間も血液採取から測定終了まで約  $10\text{ 分}$  以内と短時間であった。

Table 1 Lactic acid in human plasma

|                   |         | Content ( $n = 5$ ) |        | Recovery ( $n = 5$ ) |             |        |
|-------------------|---------|---------------------|--------|----------------------|-------------|--------|
|                   |         | Lactic acid/mM      | RSD, % | Added/mM             | Recovery, % | RSD, % |
| Plasma A          | Fasting | 1.26 (1.25)*        | 3.56   | 1.44                 | 98.7        | 3.34   |
|                   | After   | 2.32 (2.20)*        | 2.26   | 2.56                 | 94.0        | 2.55   |
| Plasma B<br>+ NaF | Fasting | 0.908 (0.919)*      | 3.69   | 0.829                | 92.2        | 3.46   |
|                   | After   | 2.34 (2.28)*        | 2.79   | 2.14                 | 93.7        | 2.32   |

\* F-KIT ( $n = 2$ )

これにより、循環系及び代謝系における異常や疾患を探るための乳酸のモニタリングに有用であると考えられる。本法は、食品や生体試料など、様々な試料に対しても簡便な前処理で測定が可能であると思われる。

### 文 献

- 1) J. Darnell, H. Lodish, D. Baltimore: "Molecular Cell Biology", Second Edition, p. 588 (1990), (Scientific American Books).
- 2) 戸谷誠之: "広範囲 血液・尿化学検査, 免疫学的検査 (1)", 第5版, p. 642 (1999), (日本臨床).
- 3) 戸谷誠之: "乳酸. 検査と技術 18", p. 74 (1990), (医学書院).
- 4) 金井 泉: "臨床検査法提要", 第31版, 金井正光編, p. 540 (1998), (金原出版).
- 5) N. Shimojo, K. Naka, H. Uenoyama, K. Hamamoto, K. Yoshioka, K. Okuda: *Clin. Chem.*, **39**, 2312, (1993).
- 6) K. Takamura, Y. Hayakawa: *Anal. Chim. Acta*, **43**, 273 (1968).
- 7) F. Kusu, T. Fuse, K. Takamura: *J. AOAC Int.*, **77**, 1686 (1994).
- 8) K. Takamura, T. Fuse, K. Arai, F. Kusu: *J. Electroanal. Chem.*, **468**, 53 (1999).
- 9) A. Kotani, T. Fuse, F. Kusu: *Anal. Biochem.*, **284**, 65 (2000).

### 要 旨

キノンの還元反応に基づいた酸の電気化学検出 HPLC を用い、血しょう中乳酸値の定量を行った。乳酸量 0.1 ~ 40 nmol 範囲で良い直線性 ( $r > 0.999$ ) を示し、RSD は 1.18% (10 nmol・乳酸,  $n = 10$ ) であった。14 時間絶食後と食後 1 時間の血しょう中乳酸を定量したところ、それぞれ 1.26, 2.32 mM であった。RSD は 3.6% 以下 ( $n = 5$ )、添加回収率は 94% 以上と良好な結果が得られた。市販の乳酸測定キット (F-キット) での測定結果と比較したところ、よく一致した。また、測定に必要な血しょうの量は F-キットに比べ 10 分の 1 以下であった。本法は、複雑な抽出操作を必要とせず、少量の血液と非常に簡単な前処理のみで測定が可能であり、循環系及び代謝系における異常や疾患を探るための乳酸のモニタリングに有用と考えられる。