



# キャピラリーゾーン電気泳動法によるヒト血清中の塩化物イオン, 無機リン酸, クエン酸の定量

喜多, 謙治 ; 福士, 恵一 ; 平岡, 厚 ; 鈴木, 祥史 ; 副島, 昭典 ; 宮道, 隆

---

(Citation)

分析化学, 60(8):671-674

(Issue Date)

2011-08-05

(Resource Type)

journal article

(Version)

Version of Record

(Rights)

©2011The Japan Society for Analytical Chemistry

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/90002789>



## ノ ー ト

# キャピラリーゾーン電気泳動法によるヒト血清中の 塩化物イオン、無機リン酸、クエン酸の定量

喜多 謙治<sup>1</sup>, 福士 恵一<sup>®1</sup>, 平岡 厚<sup>2</sup>, 鈴木 祥史<sup>2</sup>, 副島 昭典<sup>2</sup>, 宮道 隆<sup>3</sup>

## 1 緒 言

人体になんらかの疾患がある場合、ヒト血清中成分濃度は異常値を示すことが知られている。例えば、塩化物イオン濃度の正常値は95.1～113 mEq/Lであるが、慢性肺疾患や髄膜炎では低下する。また、無機リン酸濃度の正常値は2.07～5.07 mg/dLであるが、副甲状腺機能亢進や副腎皮質不全では低下し、腎疾患等では上昇する<sup>1)</sup>。さらに、クエン酸濃度の正常値は1.95～12.9 mg/dLであるが、低酸素状態やカルシウム代謝異常などにおける異常高値が報告されている<sup>2)</sup>。従って、血清中のこれら成分を定量することは関連する疾患を発見し、適切な治療を行う上で有意義であると考えられる。

従来、これら成分はそれぞれ、イオン電極法(塩化物イオン)や酵素法(無機リン酸、クエン酸)等により別々に定量されている。一方、ヒト汗、血清、尿、脳脊髄液等生体試料中の無機イオン<sup>3)～22)</sup>、有機酸<sup>7)10)13)23)～26)</sup>、アミンやアミノ酸<sup>14)</sup>、糖類<sup>27)</sup>の定量にキャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)が用いられている。しかし、著者らの知る限り、CZEによるヒト血清中の塩化物イオン、無機リン酸、クエン酸の同時定量に関する報告はほとんど見あたらない。

著者らは、現在までに、CZEによる海水中のリン酸イオン定量法を確立した<sup>28)29)</sup>。海水と血清の主要成分組成は類似しており、本研究では、この方法をもとに、CZEによるヒト血清中の塩化物イオン、無機リン酸、クエン酸の同時定量法を確立した。次いで、確立した定量法により、精度管理用血清及び健康な成人血清中のこれら成分を定量し、従来法による結果と比較した。

## 2 実 験

### 2.1 装 置

装置は、紫外-可視吸光検出器を備えたパーキンエルマー製キャピラリー電気泳動装置270Aを用いた。キャピ

ラリーはジーエルサイエンス製フューズドシリカ管(内径75 µm, 外径375 µm, 全長72 cm, 有効長50 cm)である。データ処理は、日立製D-2500クロマトインテグレーターで行った。pH測定には、堀場製カスティーLAB pHメーターF-22を用いた。

### 2.2 試 薬

試薬はすべて特級品を使用した。2,6-ピリジンジカルボン酸(PDC)はナカライテスク、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)はSigma-Aldrichから購入した。泳動液(BGE)として、5 mmol/L PDC水溶液を調製し、1 mol/L 水酸化ナトリウム(ナカライテスク製)水溶液を用いてpH 3.5に調整した。その後、電気浸透流(EOF)を抑制するためにHPMCを0.01%になるように添加した。標準溶液として50 mmol/L 塩化ナトリウム(ナカライテスク製)、0.50 mmol/L リン酸二水素カリウム(和光純薬工業製)、0.50 mmol/L クエン酸一水和物(ナカライテスク製)溶液を調製し、適宜希釈して使用した。BGE調製の際に使用した純水は、ヤマト科学製WG220型純水製造装置及び日本ミリポア製Simpli Lab超純水製造装置により得られたものである。なお、BGEは使用する前に0.45 µmのメンブランフィルター(アドバンテック製)でろ過した。

### 2.3 血清試料

試料として、精度管理用血清(オリエンタル酵母工業製液状ネスコール-N(正常域、未処理)及び-A(異常域、未処理))と健康な成人血清13検体(除タンパク済み及び未処理、杏林大学から入手)を用いた。除タンパクは、健康な成人血清0.5 mLを分子量cut off値10000の限外ろ過膜を装着したUntracel-10k(アミコン製)を用い、740 gで10分間遠心限外ろ過して行った。これら試料は分析前に純水で10倍に希釈した。

### 2.4 定量操作法

血清中では、塩素は塩化物イオン(Cl<sup>-</sup>)として存在するが、無機リン酸及びクエン酸はpHにより異なるイオン種として存在する。CZEでは、両者はそれぞれ異なるイオ

<sup>1</sup> 神戸大学大学院海事科学研究科: 658-0022 兵庫県神戸市東灘区深江南町 5-1-1

<sup>2</sup> 杏林大学保健学部: 192-8508 東京都八王子市宮下町 476

<sup>3</sup> 近畿職業能力開発大学校: 596-0103 大阪府岸和田市稲葉町 1778

Table 1 Precision, detection limits, and regression equations for determination of chloride, inorganic phosphate, and citric acid using CZE<sup>a)</sup>

Analyte	RSD <sup>b)</sup> / %			LOD ( $S/N = 3$ ) / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Concentration / $\text{mmol L}^{-1}$	Regression equation (correlation coefficient)	
	Area	Height	Time			Area	Height
$\text{Cl}^-$	0.62	0.34	0.37	4.7	0–20	$y = 1.51 \times 10^5 x - 1.84 \times 10^4$ (0.9999)	$y = 1.20 \times 10^3 x + 4.42 \times 10^3$ (0.9591)
$\text{PO}_4^{3-}$	1.3	0.43	0.45	2.0	0–0.20	$y = 4.62 \times 10^5 x + 8.50 \times 10^2$ (0.9998)	$y = 7.14 \times 10^4 x + 4.42 \times 10^3$ (0.9949)
Citric acid	3.2	3.1	1.1	1.3	0–0.050	$y = 6.80 \times 10^4 x + 2.74 \times 10^2$ (0.9996)	$y = 4.57 \times 10^4 x + 2.77 \times 10^2$ (0.9723)

a) Electrophoretic conditions : capillary,  $L_{\text{tot.}} = 72$  cm,  $L_{\text{det.}} = 50$  cm,  $75 \mu\text{m}$  I.D.  $\times$   $375 \mu\text{m}$  O.D. ; BGE, 5 mmol/L 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDC) containing 0.01 % hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) adjusted to pH 3.5 with 1 mol/L sodium hydroxide ; voltage, 15 kV with the sample inlet side as the cathode ; wavelength for detection, 273 nm. b) Sample, standard solution containing 0.10 mmol/L  $\text{PO}_4^{3-}$ -P, 10 mmol/L  $\text{Cl}^-$ , and 0.030 mmol/L citric acid ; vacuum injection period, 3 s (*ca.* 63 nL); eight determinations

ン種の総和として定量されるが、今後、便宜的にそれぞれ、 $\text{PO}_4^{3-}$ 、クエン酸と表示する。また、これら成分は、 $\text{Cl}^-$ を除き、一般に紫外及び可視部において吸収を持たないため、CZEでは間接吸光法を用いる必要がある。間接吸光法において、分析目的イオンは、BGEに添加された吸収を持つイオン（間接吸収剤）と置き換わることにより、間接吸収剤の濃度が減少して負のピークとして検出される<sup>28)</sup>。本研究では、間接吸収剤としてPDCを使用した。

血清試料は以下の操作法により分析した。まず、検出器の波長を273 nm、恒温槽温度を30℃に設定した。新しいキャピラリーの場合には、1 mol/L水酸化ナトリウムで40分、純水で10分洗浄した。まず、BGE (0.01 % HPMCを含む5 mmol/L PDC, pH 3.5) をキャピラリーに3分充填した。次いで、試料を真空吸引法 (16.9 kPa) により3秒 (約63 nL) 注入した後、試料注入側を陰極として15 kV印加した。

### 3 結果と考察

#### 3.1 検量線

確立された方法により、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$ 、クエン酸標準溶液を用いて検量線を作成したところ、直線性の良いものが得られた。検量線の回帰式、ピーク面積、ピーク高さ、泳動時間の相対標準偏差 (RSD, %)、検出限界 (LOD,  $S/N = 3$ ) をTable 1に示す。本法の $\text{Cl}^-$ のLOD (4.7  $\mu\text{mol/L}$ ) は、Jagerら<sup>7)</sup>の方法 (試料を電気的に導入) のLOD (110  $\mu\text{mol/L}$ ) の約1/20, Yangら<sup>8)</sup>の方法のLOD (8.5  $\mu\text{mol/L}$ ) の約1/2, Wanら<sup>11)</sup>の方法のLOD (0.58  $\mu\text{mol/L}$ ) の約8倍であった。また、本法の $\text{PO}_4^{3-}$ のLOD (2.0  $\mu\text{mol/L}$ ) は、Yangら<sup>8)</sup>の方法のLOD (10  $\mu\text{mol/L}$ ) の1/5であった。さらに、本法のクエン酸のLOD (1.3  $\mu\text{mol/L}$ ) は、Křivánkováら<sup>24)</sup>の方法のLOD (2.2  $\mu\text{mol/L}$ ) の約1/1.7, Muñozら<sup>26)</sup>の方法のLOD (11  $\mu\text{mol/L}$ ) の約1/8であった。ヒト血清中 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$ 、クエン酸濃度の正常値<sup>1)2)</sup>はそれぞれ約95.1 ~ 113, 0.668 ~ 1.64, 0.0830 ~ 0.549 mmol/Lであるため、

本法はこれら成分に対して十分な感度を有していると考えられる。

#### 3.2 除タンパクの影響

CZEにより生体試料を分析する場合、通常、キャピラリー内壁へのタンパクの吸着を抑制するために、限外濾過<sup>4)9)</sup>、BGEへの両性界面活性剤の添加<sup>5)</sup>、試料へのアセトニトリル添加<sup>10)</sup>、電気透析<sup>22)</sup>等により除タンパクが行われている。本法では、EOFを抑制する目的でBGEに添加したHPMCがキャピラリー内壁を覆い、タンパクの吸着を抑制する効果が期待できると考えた。そこで、除タンパク済み及び未処理の成人血清を本法により分析した。 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$ 、クエン酸のピーク面積、ピーク高さ、泳動時間のRSD及びそれらの定量結果をTable 2に示す。これより、除タンパクの影響はほとんど見られず、本法は、生体試料分析において除タンパクを要しないことが判明した。なお、本法の $\text{Cl}^-$ のRSDは、ピーク面積1.3 %、泳動時間0.54 %であり、Jagerら<sup>7)</sup>の方法 (ピーク面積のRSDは5.0 %、泳動時間のRSDは4.7 %) より再現性の良い結果が得られた。

#### 3.3 血清試料の定量

本法により、精度管理用血清 (正常域及び異常域)、健康な成人血清中の $\text{Cl}^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$ 、クエン酸を定量した結果をTable 3に示す。Fig. 1は健康な成人血清のエレクトロフェログラムである。本法による精度管理用血清中 $\text{Cl}^-$ 及び $\text{PO}_4^{3-}$ 定量結果は、メーカーによる表示値とほぼ同様であった。また、本法及び従来法による健康な成人血清中 $\text{Cl}^-$ 及び $\text{PO}_4^{3-}$ 定量結果についてt検定<sup>30)</sup>を行ったところ、有意水準5 %で有意差があるとは言えないことがわかった。なお、クエン酸については血清の試料量が少なく、従来法により定量できなかったが、定量結果はほぼ正常値と同様であった。

Table 2 Effects of deproteinization on precision and the analytical results for chloride, inorganic phosphate, and citric acid in a human serum of a healthy adult<sup>a)</sup>

Analyte	RSD <sup>b)</sup> / %						Analytical results	
	Area		Height		Time			
	Without depro. <sup>c)</sup>	With depro.	Without depro.	With depro.	Without depro.	With depro.	Without depro.	With depro.
Cl <sup>−</sup>	1.3	1.0	0.61	0.47	0.54	0.35	109 ± 1 <sup>d)</sup>	103 ± 1
PO <sub>4</sub> <sup>3−</sup>	0.72	1.6	0.48	0.69	0.74	0.51	3.9 ± 0.02 <sup>e)</sup>	3.8 ± 0.04
Citric acid	4.1	4.0	2.0	3.0	0.72	0.65	2.8 ± 0.1 <sup>f)</sup>	2.6 ± 0.2

a) Electrophoretic conditions as in Table 1 ; b) Eight determinations ; c) depro., abbreviation of deproteinization ; d) mEq/L ; e) mg/dL ; f) mg/dL

Table 3 Analytical results for chloride, inorganic phosphate, and citric acid in serum samples

Sample	Cl <sup>-</sup> /mEq L <sup>-1</sup>		PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P/mg dL <sup>-1</sup>		Citric acid/mg dL <sup>-1</sup>
	CZE <sup>a)</sup>	Conven. <sup>b)</sup>	CZE	Conven.	CZE
1 <sup>c)</sup>	102 ± 3	94 <sup>e)</sup>	4.4 ± 0.1	4.4 <sup>e)</sup>	—
2 <sup>d)</sup>	128 ± 1	116 <sup>e)</sup>	8.4 ± 0.2	7.6 <sup>e)</sup>	—
3 <sup>f)</sup>	91 ± 1	104	2.9 ± 0.1	3.4	—
4 <sup>f)</sup>	83 ± 0.8	101	2.2 ± 0.06	2.7	—
5 <sup>f)</sup>	95 ± 0.9	100	2.6 ± 0.08	2.4	—
6 <sup>f)</sup>	108 ± 1	101	2.7 ± 0.06	2.3	—
7 <sup>f)</sup>	102 ± 0.6	101	3.2 ± 0.1	3.4	—
8 <sup>f)</sup>	114 ± 0.7	100	2.4 ± 0.08	2.2	2.1 ± 0.1
9 <sup>f)</sup>	104 ± 0.4	100	2.6 ± 0.04	4.1	2.8 ± 0.1
10 <sup>f)</sup>	106 ± 1	98	3.5 ± 0.1	3.3	2.8 ± 0.1
11 <sup>f)</sup>	125 ± 2	106	3.7 ± 0.03	4.1	3.7 ± 0.2
12 <sup>f)</sup>	103 ± 1	101	3.8 ± 0.04	4.1	2.6 ± 0.2
13 <sup>f)</sup>	104 ± 0.6	104	3.8 ± 0.03	4.1	1.5 ± 0.2
14 <sup>f)</sup>	104 ± 0.8	97	3.5 ± 0.03	3.8	1.7 ± 0.1
15 <sup>f)</sup>	109 ± 0.9	96	4.0 ± 0.09	3.8	1.6 ± 0.1

a) CZE, capillary zone electrophoresis, electrophoretic conditions as in Table 1, three determinations ; b) conven., abbreviation of conventional method ; c) a serum sample for quality control (normal range); d) a serum sample for quality control (abnormal range); e) analytical results by the manufacturer ; f) human serum of healthy adults

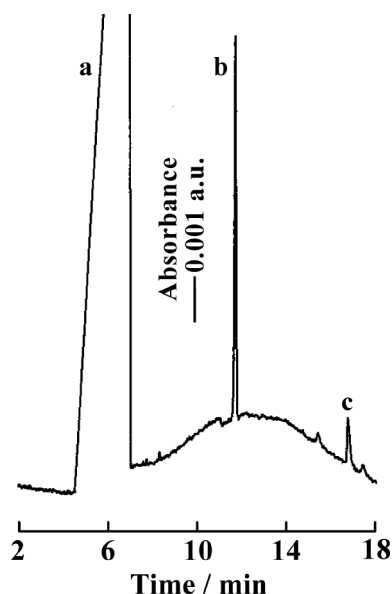


Fig. 1 Electropherogram for chloride, inorganic phosphate, and citric acid in a human serum sample. Sample, a human serum from a healthy adult without deproteinization. Identification of peaks : a, Cl<sup>-</sup> ; b, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> ; c, citric acid. Electrophoretic conditions as in Table 1

#### 4 結 言

CZE によるヒト血清中の塩化物イオン (Cl<sup>-</sup>), 無機リン酸 (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), クエン酸の同時定量法を確立した。本法は血清の除タンパクを必要としない簡易な方法であることがわかった。今回は3成分のみを対象としたが, 糖尿病や肝臓疾患がある場合, 乳酸は異常高値を示すことが知られており<sup>31)</sup>, 今後, 乳酸を含め他の血清中成分についても同時に定量できる方法を確立したい。

(2010年9月, 日本分析化学会)  
第59年会において一部発表

#### 文 献

- 1) 瀬山義幸, 林 秀徳, 春本文枝, 山下三郎訳: “診断生化学”, 山下三郎編, p. 472 (1978), (広川書店) ; R. L. Searcy: “Diagnostic Biochemistry”, (1969), (McGraw-Hill Book Company).
- 2) 一式 玄, 周山逸人: 日本臨床, **47**, 479 (1989).
- 3) 寺澤純子, 三矢光太郎, 石井 晃, 津田孝雄: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **50**, 813 (2001).
- 4) E. Morcos, N. P. Wiklund: *Electrophoresis*, **22**, 2763 (2001).
- 5) M. Mori, W. Hu, K. Hasebe, S. Tanaka, K. Tanaka: *Anal. Bioanal. Chem.*, **374**, 75 (2002).
- 6) T. Miyado, H. Nagai, S. Takeda, K. Saito, K. Fukushi, Y. Yoshida, S. Wakida, E. Niki: *J. Chromatogr. A*, **1014**, 197 (2003).
- 7) A. V. Jager, M. F. M. Tavares: *Electrophoresis*, **24**, 1208 (2003).

- 8) W. Yang, Z. Zhang : *Anal. Lett.*, **36**, 465 (2003).
- 9) T. Miyado, Y. Tanaka, H. Nagai, S. Takeda, K. Saito, K. Fukushima, Y. Yoshida, S. Wakida, E. Niki : *J. Chromatogr. A*, **1051**, 185 (2004).
- 10) Y. Tanaka, N. Naruishi, H. Fukuya, J. Sakata, K. Saito, S. Wakida : *J. Chromatogr. A*, **1051**, 193 (2004).
- 11) Q. J. Wan, P. Kubáň, J. Tanyanyiwa, A. Rainelli, P. C. Hauser : *Anal. Chim. Acta*, **525**, 11 (2004).
- 12) A. Gáspár, P. Juhász, K. Bágyi : *J. Chromatogr. A*, **1065**, 327 (2005).
- 13) G. A. Blanco-Heras, M. I. Turnes-Carou, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, E. Fernández-Fernández : *J. Chromatogr. A*, **1144**, 275 (2007).
- 14) T. Hirokawa, H. Okamoto, Y. Gosyo, T. Tsuda, A. R. Timerbaev : *Anal. Chimica. Acta*, **581**, 83 (2007).
- 15) M. Grau, U. B. Hendgen-Cotta, P. Brouzos, C. Drexhage, T. Rassaf, T. Lauer, A. Dejam, M. Kelm, P. Kleinbongard : *J. Chromatogr. B*, **851**, 106 (2007).
- 16) A. R. Timerbaev : *J. Sep. Sci.*, **31**, 2012 (2008).
- 17) A. Hiraoka, S. Ikeda, K. Fukushi, I. Tominaga, K. Hori : *Trends Chrom.*, **4**, 37 (2008).
- 18) Z. Xu, T. Doi, A. R. Timerbaev, T. Hirokawa : *Talanta*, **77**, 278 (2008).
- 19) J. P. Pascali, E. Liotta, R. Gottardo, F. Bortolotti, F. Tagliaro : *J. Chromatogr. A*, **1216**, 197 (2009).
- 20) J. P. Pascali, D. Sorio, F. Bortolotti, F. Tagliaro : *Anal. Bioanal. Chem.*, **396**, 2543 (2010).
- 21) L. Vitali, V. T. Fávere, G. A. Micke : *J. Chromatogr. A*, **1218**, 2327 (2011).
- 22) T. K. O. Doan, P. Kubáň, P. Kubáň, I. K. Kiplagat, P. Boček : *Electrophoresis*, **32**, 464 (2011).
- 23) P. Gebauer, L. Křivánková, P. Pantůčková, P. Boček, W. Thormann : *Electrophoresis*, **21**, 2797 (2000).
- 24) L. Křivánková, P. Pantůčková, P. Gebauer, P. Boček, J. Caslavská, W. Thormann : *Electrophoresis*, **24**, 505 (2003).
- 25) Y. Guan, T. Wu, J. Ye : *J. Chromatogr. B*, **821**, 229 (2005).
- 26) J. A. Muñoz, M. López-Mesas, M. Valiente : *Talanta*, **81**, 392 (2010).
- 27) C. R. Dong, J. Hao : *Analyst*, **136**, 1753 (2011).
- 28) 岡本孝明, 福士恵一, 横田久里子, 竹田さほり, 脇田慎一 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **55**, 627 (2006).
- 29) T. Okamoto, K. Fukushi, S. Takeda, S. Wakida : *Electrophoresis*, **28**, 3447 (2007).
- 30) 藤森利美 : “分析技術者のための統計的方法”, p. 178 (1995), (社団法人日本環境測定分析協会).
- 31) 川知雅典, 河野典夫, 樽井精一郎 : 日本臨床, **47**, 493 (1989).

## Determination of Chloride, Inorganic Phosphate, and Citric Acid in Human Serum Using Capillary Zone Electrophoresis

Kenji KITA<sup>1</sup>, Keiichi FUKUSHI<sup>1</sup>, Atsushi HIRAOKA<sup>2</sup>, Yoshifumi SUZUKI<sup>2</sup>,  
Akinori SOEJIMA<sup>2</sup> and Takashi MIYADO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Kobe University Graduate School of Maritime Sciences, 5-1-1, Fukaeminami-machi, Higashinada-ku, Kobe-shi, Hyogo 658-0022

<sup>2</sup> Faculty of Health Sciences, Kyorin University, 476, Miyashita-cho, Hachioji-shi, Tokyo 192-8508

<sup>3</sup> Kinki Polytechnic College, 1778, Inaba-cho, Kishiwada-shi, Osaka 596-0103

(Received 11 April 2011, Accepted 20 May 2011)

We developed a capillary zone electrophoresis (CZE) method with indirect UV detection for the simultaneous determination of major constituents, such as chloride (expressed as  $\text{Cl}^-$ ), inorganic phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), and citric acid in a human serum. The limits of detection (LODs) for  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , and citric acid were, respectively, 4.7, 2.0, and 1.3  $\mu\text{mol/L}$  at a signal-to-noise ratio of three. The relative standard deviation (RSD,  $n = 8$ ) of the peak area obtained for  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , and citric acid in human serum from a healthy adult without deproteinization were 1.0, 1.6, and 4.0 %, respectively. The analytes were detected within 18 min. Dproteinization was not required using a background electrolyte (BGE) containing 0.01% hydroxypropylmethylcellulose (HPMC). The analytical results for  $\text{Cl}^-$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  in serum samples for quality control and human serum samples from healthy adults obtained by the proposed method agreed with those obtained by conventional methods. The proposed procedure could be useful as a simple diagnostic method for patients suffering from some diseases.

**Keywords :** capillary zone electrophoresis ; chloride ; citric acid ; human serum ; inorganic phosphate.