

## 機器紹介

## 化学発光分析装置

福島和昭\* 内田和秀\*

## はじめに

紫外吸光検出器 (UV) に比較し、選択性、感度とも高い蛍光検出器の感度を、更に上昇させる手段の1つに、光源出力を増大させる方法がある。しかし散乱などの光源由来の雑音により、S/Nの向上があまり望めない。そこで、光源を使用しない化学発光 (CL) 分析装置が開発された。

一方、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) はその汎用性の高さから、化学、薬学および医学などの、広範囲に普及している分離分析法である。近年、CL 検出器を用いた HPLC の高感度定量法が検討されているので、ここに簡単に紹介する。

## 原理および装置

特定の化学反応の結果生成した励起状態の分子が、基底状態に遷移する時に光を放射する現象を CL といい、血痕の鑑別に用いられるルミノール反応はその1例である。ちなみに生物に於いて、酵素が関与する発光反応を生物発光 (ホタルや夜光虫が例として上げられる) というが、本質的に

は CL と同様である。この CL を検出器内フローセルに近接する光電子増倍管にて測光し、電気信号に変換して記録する。従って本法に於ける感度は、反応系の発光強度と光電子増倍管の性能に依存する。

本邦で入手可能な HPLC 用 CL 分析装置を数例表1に紹介する。

## モルフィンの定量

HPLC-CL によるモルフィンの定量がおこなわれている<sup>1)</sup>。装置図を図1に示す。分離にはスチ

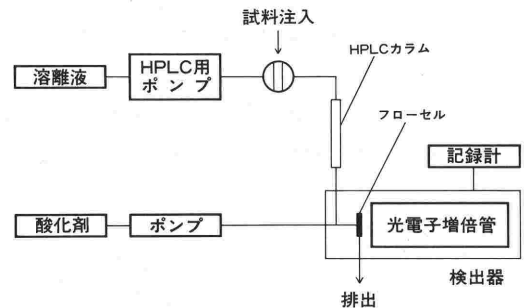


図1 モルフィン定量のための HPLC 分析装置

表1 HPLC 用 CL 分析装置

機種	測光波長/nm	備考	会社名	価格/¥
S-3400	300-650	二方式フローセル	相馬光学	880,000
825-CL	300-600	液漏センサ内蔵	日本分光	950,000
CLD-100	300-650	電子冷却装置付	東北電子産業	2,500,000
CL-1	200-800	セル容量 250 $\mu$ l	昭和電工	1,000,000
AC-2220	300-650	セル容量 60 $\mu$ l	アトー	850,000
LC-30-DPC10	340-600	デジタルフィルター	日本電子	1,500,000

\*防衛医科大学校麻酔学教室

レンジビニルベンゼン樹脂を充填した逆相カラムを、内部標準物質 (IS) には N-エチルモルフィンを使用している。尿および血液試料を用いた場合、検量線は  $0.1\text{--}500\ \mu\text{g/ml}$  の範囲で直線 ( $r=0.9952$ ) を示し、検出限界は  $50\ \text{ng/ml}$  と高感度である。ジヒドロモルフィンが多少本分析を妨害するものの、他の構造類似物質とは完全に分離したピークを示すので問題はない。

#### アセチルコリンの定量

HPLC-CL を用いたアセチルコリン (ACh) およびコリン (Ch) の同時定量が検討されている<sup>2)3)</sup>。分離カラムによる試料中 ACh および Ch の分離、その後の酵素反応による過酸化水素の生成、過酸化水素の関与する CL 反応およびその検出によるものである。

Honda らの方法<sup>2)</sup> では蛍光物質としてペリレンを、IS としてエチルホモコリンを使用している。検量線の直線範囲は  $10\ \text{pmol}\text{--}10\ \text{nmol}$  であり、検出限界は約  $1\ \text{pmol}$  ( $S/N=3$ ) である。ACh および Ch 各  $10\ \text{pmol}$  を試料とした場合、再現性は  $RSD=3.3$  および  $6.0\%$  ( $n=3$ ) であり、 $10\ \text{nmol}$  では各々  $RSD=1.6$  および  $1.2\%$  ( $n=3$ ) である。

van Zoonen らの方法<sup>3)</sup> では蛍光物質として3-アミノフルオランセンを使用している。検量線の直線範囲は  $1\ \text{pmol}\text{--}10\ \text{nmol}$  ( $n=8$ ,  $r=0.9997$ ) であり、ACh および Ch の検出限界は各々  $0.7$  および  $0.5\ \text{pmol}$  ( $S/N=3$ ) である。ACh, Ch それぞれ

$20\ \text{pmol}$  ( $20\ \mu\text{l}$ ) を試料とした場合の再現性は、各々  $RSD=3.7$  および  $3.4\%$  ( $n=5$ ) である。

#### おわりに

上記定量法の他に過酸化脂質の定量が報告されており<sup>4)</sup>、医学的に興味深い。また HPLC を用いないバッチ法 (用手法) での活性酸素 (スーパーオキシド、過酸化水素および1重項酸素) の定量法も解説されている<sup>5)</sup>。

今後、電気化学検出器や質量分析計と並び、CL 分析装置を用いた HPLC の超高感度分析法の更なる発展が期待される。

#### 文 献

- 1) Abbott, R. W. et al.: Determination of morphine in body fluids by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Analyst*, **112**, 397-406 (1987).
- 2) Honda, K. et al.: High-performance liquid chromatography followed by peroxyoxalate chemiluminescence detection of acetylcholine and choline utilizing immobilized enzymes. *Anal. Biochem.*, **153**, 50-53 (1986).
- 3) van Zoonen, P. et al.: HPLC detection of choline and acetylcholine in serum and urine by an immobilized enzyme reactor followed by chemiluminescence detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **5**, 485-492 (1987).
- 4) Yamamoto, Y. et al.: Detection and characterization of lipid hydroper-oxides at picomole levels by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **160**, 7-13 (1987).
- 5) 中野 稔: 活性酸素の化学発光による検出法. 蛋白質 核酸 酸素, **33**, 2699-2707 (1988).