

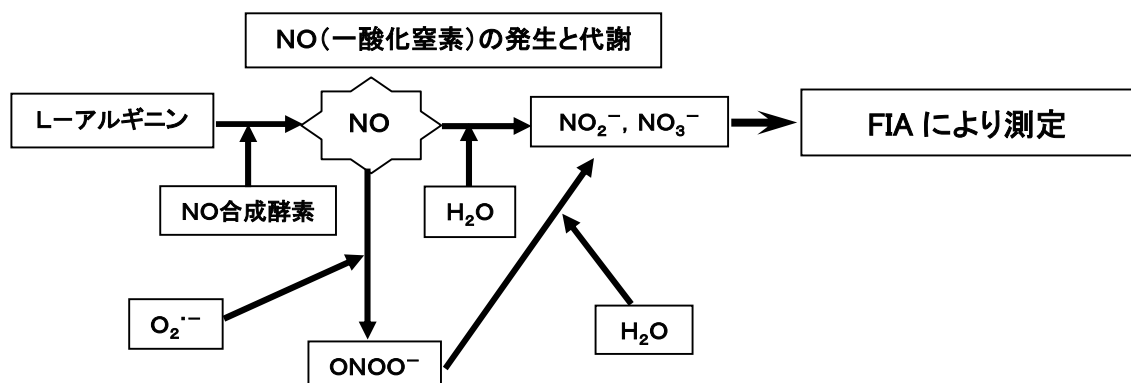
生体試料中のNO（一酸化窒素）代謝物の分析

【はじめに】

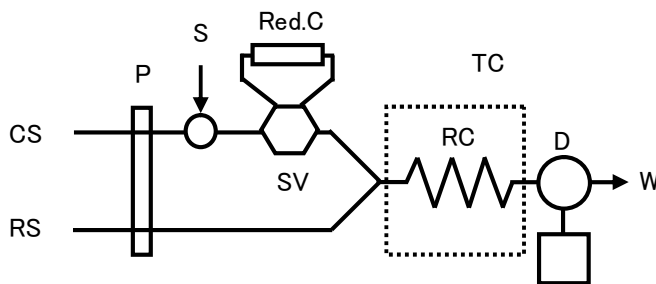
近年、医学の分野では生体内で生成する一酸化窒素（NO）の生理作用が大変注目されています。NOは血管の弛緩作用や発がんの機構、神経伝達・学習・記憶などにも関与していると言われています。また、最近では集中治療の分野においてNOガス吸入療法への期待が高まっています。

NOの一般的測定方法としては化学発光法や電極法、電子スピン共鳴（ESR）法、Griess法などがあります。このうちGriess法はNOの代謝物であるNO₂⁻がGriess試薬と反応して生成するアゾ化合物の吸光度を測定する方法で、NOの生成量を推測するもっとも簡便な方法として知られています。従来は試料中のNO₂⁻量によってのみNO産生量を推測していましたが、最近では生体試料中で代謝されたNO₂⁻のほとんどはさらに酸化されてNO₃⁻となることがわかり、(NO₂⁻+NO₃⁻)のトータル量によってNOの産生量を推測することが有力視されるようになりました。

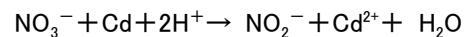
弊社では適切な前処理を施すことにより、試料を注入するだけの簡単な操作で生体試料中の(NO₂⁻+NO₃⁻)を高感度に、かつ高精度に分析できる装置を開発しました。



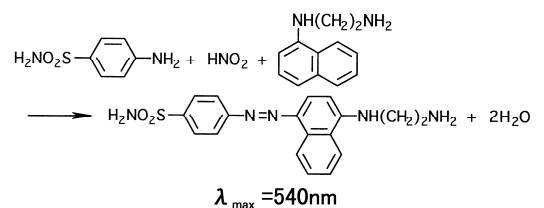
【フローダイアグラムと測定原理】



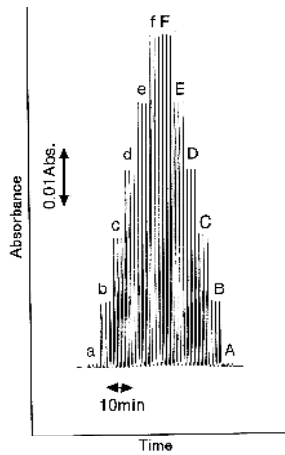
CS：キャリアー溶液（EDTA + NH₄Cl）、RS：試薬溶液（SA+NEDA）、P：送液ポンプ（1.0ml min⁻¹）、S：サンプルインジェクター（100μl）、SV：六方切り替えバルブ、Red.C：Cd-Q還元カラム、TC：反応恒温槽（40℃）、RC：反応コイル（0.5mmi.d.×2m）、D：検出器（540nm）、R：記録計、W：廃液

NO₃⁻からNO₂⁻への還元

ジアゾ化カップリング反応

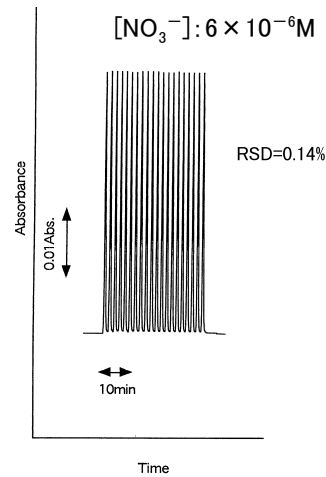


【検量線シグナル】



$[\text{NO}_2^-](\times 10^{-6}\text{M})$
 a.0; b.2; c.4; d.6; e.8; f.10
 $[\text{NO}_3^-](\times 10^{-6}\text{M})$
 A.0; B.2; C.4; D.6; E.8;

【再現性テスト】



【前処理方法】

尿サンプルはキャリアー溶液で 50 倍から 100 倍に希釈して分析を行います。血清、血漿、細胞培養液は 5% ZnSO_4 -0.3M NaOH 系で除たんぱくをした後にシステムに注入して分析を行います。組織はサンプルを 10 倍量の H_2O でホモジネートし、遠心分離した上清を血清、血漿などと同様の除たんぱくをした後にシステムに注入して分析を行います。

【再現性テスト】

尿

前処理	RSD	n	濃度
直接希釈	2.64%	10	$16.5 \times 10^{-4}\text{M}$
2段階希釈	2.08	10	15.4
除たんぱく	1.17	10	16.0

血清

サンプル	RSD	n	濃度
1	2.64%	8	$116 \times 10^{-6}\text{M}$
2	3.07	7	56.4
3	2.08	3	42.0

標準液

直接注入

$[\text{NO}_3^-] : 6 \times 10^{-6}\text{M}$ RSD = 0.14 % (n=10)

除たんぱく

$[\text{NO}_3^-] : 1 \times 10^{-4}\text{M}$ RSD = 0.87 % (n=10)

【回収率テスト】

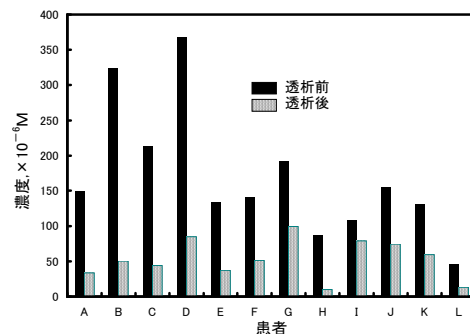
尿

サンプル	濃度 ($\times 10^{-4}\text{M}$)	添加量 ($\times 10^{-4}\text{M}$)	回収量 ($\times 10^{-4}\text{M}$)	回収率 (%)
a	6.3	4.0	10.4	101.0
b	9.7	3.8	13.1	96.8
c	16.5	3.8	19.9	97.9

血清

サンプル	濃度 ($\times 10^{-6}\text{M}$)	添加量 ($\times 10^{-6}\text{M}$)	回収量 ($\times 10^{-6}\text{M}$)	回収率 (%)
4	36.6	42.4	79.0	100.0
5	10.1	42.4	50.5	96.2
6	8.7	42.4	48.7	95.3
7	82.6	42.4	123.2	98.6

【分析例】一腎透析患者の血清中の ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) の分析



【参考文献】

K.Higuchi, S.Motomizu: *Anal.Sci.*, 15, 129(1999).