

報 文

ガスかき混ぜ溶媒抽出分離/微分パルスポーラログラフィーによる生体物質中の銅及び鉄の同時定量

永長 幸雄[®], 大谷 幸宏^{*}

(1989 年 6 月 16 日受理)

水及び有機相に窒素を通じて溶媒抽出操作を行い、その抽出溶液中で Cu(II) 及び Fe(III) を微分パルスポーラログラフィーにより同時定量する方法を検討し、生体標準物質の分析に適用した。電解セルに両金属イオンを含む水溶液を採り、 3.0 mol dm^{-3} 酢酸ナトリウム溶液 2.0 cm^3 、20% (w/v) トリクロロ酢酸溶液 0.5 cm^3 及び純水を加えて全量を 4.0 cm^3 とする。これに 0.05 mol dm^{-3} *N*-ベンゾイル-*N*-フェニルヒドロキシルアミンと 0.1 mol dm^{-3} 過塩素酸テトラブチルアンモニウムを含む 1:3 酢酸エチル-アセトニトリル混合溶液 2.0 cm^3 を加え、窒素を 7 分間通じて溶媒抽出と除酸素を行う。分相後、有機相中に三電極を差し込んで微分パルスポーラログラフィーを行うことにより、水相中の $0.05 \sim 2.0 \mu\text{g cm}^{-3}$ Cu(II) 及び Fe(III) が同時定量できた。本法を用いて、NBS 生体試料 Bovine Liver 及び Citrus Leaves、ヒト血清中の Cu 及び Fe を定量しほぼ満足できる結果を得た。

1 緒 言

臨床化学検査では血液や尿中の様々な生体成分の分析を行って、一般人の健康状態あるいは患者の病状を把握するうえで貴重なデータを提供する。従って、分析法としては正確で信頼性の高い値が得られるというばかりでなく、多数でしかも少量の試料を取り扱うために特に簡便な方法が推奨される¹⁾²⁾。

血清無機物質の中で、Cu 及び Fe の定量はその生体成分代謝の指標として臨床検査では不可欠なものであり、これまで多数の分析法が報告されている^{3)~5)}。一般に、生体中の微量 Cu 及び Fe を定量するには吸光度法や AAS が使用されており^{6)~8)}、電気化学的方法はむしろ操作の煩雑さから敬遠されているようである。最近、グルコースやアルコールといった生体有機成分の分析には電位差法や電流測定法などの電気化学的方法が用いられるようになり⁹⁾¹⁰⁾、Cu 及び Fe といった生体無機成分分析についても同様に、試料に適した電気化学的方法が今後開発されていくものと思われる。

最近著者らは、測定溶液の少量化と実験操作の簡便化を達成させる目的で、窒素ガスかき混ぜによる非水溶媒抽出/微分パルスポーラログラフィーを提案した^{11)~13)}。この方法は電解セル中で、窒素を通じて 2 相をかき混ぜ溶媒抽出した後、比較的少量の有機相中でポーラログラフィーを行うものであり、特に生体物質の

分析に有用と考えられる。本研究では酢酸エチルとアセトニトリルの混合溶媒と、抽出試薬として *N*-ベンゾイル-*N*-フェニルヒドロキシルアミン（以下 BPA と略記する）を用いた Cu(II) 及び Fe(III) のポーラログラフ同時定量法を考案した。本法は NBS 生体試料 (Bovine Liver, Citrus Leaves) 及びヒト血清中の Cu 及び Fe の定量に適用できることが分かった。

2 実 験

2.1 試 薬

Cu(II) 及び Fe(II) の標準溶液：和光純薬工業製 AAS 用 (1000 ppm) 標準溶液を希釈して使用した。

酢酸エチル-アセトニトリル混合溶媒：和光純薬工業製 LC 用試薬を体積比で 1:3 の割合で混合した。

抽出溶液 {(0.05 mol dm⁻³ BPA 及び 0.1 mol dm⁻³ 過塩素酸テトラブチルアンモニウム (以下 TBAP と略記))}：同仁化学製 BPA 及び Fluka 製 TBAP を所定濃度になるように上記混合溶媒に溶解して調製した。

トリクロロ酢酸溶液：和光純薬工業製生化学用トリクロロ酢酸を純水に溶解し 20% (w/v) 溶液を調製した。

その他の試薬は和光純薬工業製特級品をそのまま使用した。水はミリポア製ミリ-Q 純水装置で精製して使用した。

2.2 装 置

ポーラログラフは柳本製作所製 P-1000 型を使用し記

* 福井大学工学部：910 福井県福井市文京 3-9-1

録計, pH メーター, 電極, 電解セルは既報のものを用いた¹²⁾. つり下げ水銀滴電極は Metrohm 製 E410 型 (表面積 $1.8 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$) を使用した.

2.3 実験操作

2.3.1 定量操作 電解セルに, Cu(II) 及び Fe(III) を含む試料溶液 (1.5 cm^3 まで) を採り, 3.0 mol dm^{-3} 酢酸ナトリウム溶液 2.0 cm^3 , 20% トリクロロ酢酸 0.5 cm^3 , 次いで水を加えて全量を 4.0 cm^3 とした. これに 0.05 mol dm^{-3} BPA 及び 0.1 mol dm^{-3} TBAP を含む酢酸エチル-アセトニトリル混合溶液 2.0 cm^3 を加え, 窒素を流量約 $60 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ で 7 分間通じて溶媒抽出と同時に有機相 (測定溶液) の除酸素を行った. 次に, アセトニトリル飽和の窒素を測定溶液上に流しながら, 電気化学測定は滴水銀電極, 対極 (白金電極) 及び参照電極 (銀-塩化銀電極, 3 M KCl) の三電極方式で行った. 微分パルスポーラログラム (DPP) はパルス電圧 50 mV , 水銀滴下時間 1 s , 電位速度 10 mV s^{-1} で負側に掃引して記録した. 本実験条件下で分相後の有機相及び水相の体積はそれぞれ 1.13 及び 4.77 cm^3 であった. なお, 溶液温度はセルジャケット内に恒温水を循環させて $20 \pm 0.1^\circ \text{C}$ とした.

2.3.2 生体物質の前処理操作 分析した生体物質は Bovine Liver (NBS 1577a), Citrus Leaves (NBS 1572) 及びヒト血清 (和光純薬工業製正常管理血清) である. Bovine Liver と Citrus Leaves の前処理は混酸を用いる湿式灰化法により次のように行った. 試料 (約 $1 \sim 2 \text{ g}$) を精ひょうしてこれを丸底フラスコに入れ, 濃硝酸 25 cm^3 , 濃過塩素酸 25 cm^3 及び濃硫酸 15 cm^3 の混酸を加えて加熱分解させ, 蒸発近くまで乾固した. 放

冷した後, これを水に溶解し残留物を濾過し, この濾液をメスフラスコに採り, 水を加えて全量を 20 cm^3 とした.

ヒト血清の場合には, 松原法⁶⁾に従って血清 Cu 及び Fe の遊離と除タンパク操作を行ってから分析した. 50 cm^3 遠心管に血清 4.0 cm^3 を採り, 1 M 塩酸 2.0 cm^3 を加えて $80 \sim 90^\circ \text{C}$ の水浴で 2 分間加熱する. 冷蔵庫中で冷却後, トリクロロ酢酸溶液 2.0 cm^3 を加えてタンパク質の塊を細かく砕き, 遠心分離 (2000 rpm , 5 min) する. その上澄み液 2.0 cm^3 を分析に供した.

3 結果と考察

3.1 Cu(II) 及び Fe(III)-BPA 錯体のポーラログラフ挙動

BPA と錯体を生成する金属イオンのうち, 2.3.1 の操作を行った後, 還元 DPP を与えるのは Cu(II), Fe(III) 及び Mo(VI) であり, ピーク電位はそれぞれ -0.25 , -0.48 , $-0.75 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ であった. Fig. 1 には Cu(II) 及び Fe(III) 錯体のサンプルド DC ポーラログラム及び DPP を示す. 両金属イオンのピーク電位差は 0.23 V であった. この電位差は Wang らが提案している分離度¹⁴⁾に換算すると 2.5 であることから, 同時定量が十分可能であると考えられる. 又, つり下げ水銀滴電極を用いたサイクリックボルタンメトリーでは, ピーク電流は電位掃引速度の平方根に比例することから電極反応は両者とも拡散律速であった.

3.2 抽出溶媒の組成

抽出溶媒には酢酸エチルだけよりも, それにアセトニトリルを加えて混合溶媒としたものを使用したほうが水溶液中での金属 BPA 錯体の生成速度が増大し, 又 BPA による水銀溶出液と Cu 錯体の還元波の分離が大きくなることから有利であった. 酢酸エチルとアセトニトリルの混合比を変化させて, DPP を測定した結果を Fig. 2 に示す. これから, アセトニトリルの量を増やすと BPA, Cu(II) 及び Fe(III) 錯体による波分離が大きくなることが分かった. よって, 本実験では 1:3 酢酸エチル-アセトニトリル溶液を用いることにした. アセトニトリルの添加により, Cu(II) 錯体のピーク電位は負側に移行し, ピーク電流が減少した. これはアセトニトリルが何らかの形で Cu(II) 錯体と相互作用を起こすためと思われる.

3.3 pH の影響

水溶液に塩酸と水酸化ナトリウム溶液を加えて, Cu

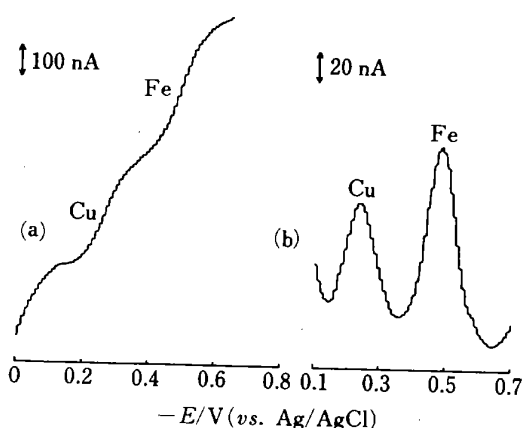


Fig. 1 Sampled dc (a) and differential pulse (b) polarograms

(a) $1.25 \mu\text{g cm}^{-3}$ Cu(II) and Fe(III); (b) $0.50 \mu\text{g cm}^{-3}$ Cu(II) and Fe(III)

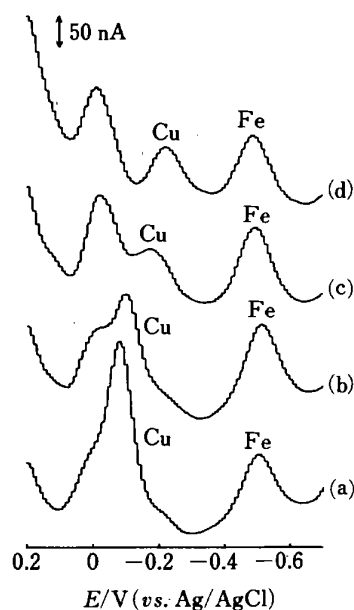


Fig. 2 Effect of volume ratio (ethyl acetate-acetonitrile) on differential pulse polarograms
(a) ethyl acetate only; (b) 3; (c) 1; (d) 1/3.
Concn. of Cu(II) and Fe(III): $0.5 \mu\text{g cm}^{-3}$

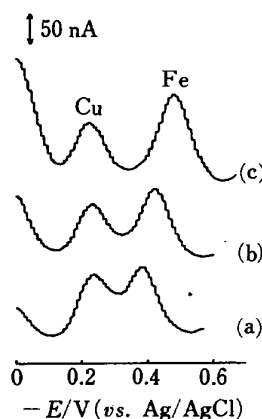


Fig. 3 Effect of pH on differential pulse polarograms
Concn. of Cu(II) and Fe(III): $0.5 \mu\text{g cm}^{-3}$; pH:
(a) 4.40, (b) 5.00, (c) 5.68

(II) 及び Fe(III)-BPA 錯体の DPP に及ぼす pH の影響について調べた。その結果、両金属イオンが定量的に抽出される pH は 4.5~10.0 の範囲であること、又 DPP における二つのピークは pH 5 以下で部分的に重複し、pH 5.4~6.6 の間では良好に分離することが分かった (Fig. 3)。特に Fe(III) 錯体では、そのピーク電位が pH の増大と共に負側に大きく移行するのが観測された。本実験では Cu(II) 及び Fe(III) を同時に定量するために、水溶液の pH を 5.7 ± 0.3 になるように調整した。

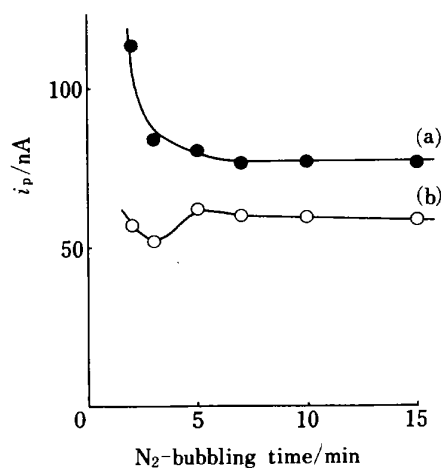


Fig. 4 Effect of N_2 -bubbling time on peak-current
(a) $0.50 \mu\text{g cm}^{-3}$ Cu(II); (b) $0.30 \mu\text{g cm}^{-3}$ Fe(III)

3・4 窒素通気時間

Cu(II) 及び Fe(III)-BPA 錯体を溶媒抽出し、更に有機相中の酸素を除くのに必要な窒素通気時間について調べた。2・3・1 の操作に従い約 60 cm^3 の流量で窒素を通気すると、Fig. 4 に示すように 5~15 分間の通気時間でピーク電流はほぼ一定となり、有機相の蒸発による影響はほとんど認められなかった。本実験では 7 分間とした。

3・5 検量線

種々の実験条件を検討して 2・3・1 の定量操作を確立し検量線を作成したところ、Cu(II) 及び Fe(III) とともに $0.05 \sim 2.0 \mu\text{g cm}^{-3}$ の濃度範囲で良好な直線を示した。得られた回帰直線 ($y = i_p/nA$, $x = c/\mu\text{g cm}^{-3}$) は Cu(II) では $y = 135x - 2.6$, Fe(III) では $y = 218x - 8.3$ で、相関係数はそれぞれ 0.9995 及び 0.9998 であった。又、 $0.2 \mu\text{g cm}^{-3}$ Cu(II) 及び Fe(III) における相対標準偏差 (10 回) はそれぞれ 3.2 及び 2.5% であった。検出限界 (S/N 比を 3 としたとき) は両金属イオンともに $0.02 \mu\text{g cm}^{-3}$ であった。

3・6 共存物質

2・1・3 の操作に従い、それぞれ $1.0 \mu\text{g cm}^{-3}$ Cu(II) 及び Fe(III) での相互干渉について調べた。その結果、Cu(II) 定量に際しては 20 倍までの Fe(III) が、Fe(III) 定量に際しては 10 倍までの Cu(II) が共存しても差し支えなかった。又、前放電物質となる V(V) は 20 倍の量までの共存は許容できた。そのほか BPA と錯体を生成する Al(III), Ni(II), Pb(II), Mo(VI), Co(II), Sb(III), Sn(II), Ti(IV) などは 50

Table 1 Analytical results for biological samples

Sample	Results, ppm	Certified values, ppm
Bovine Liver	Cu 163±17	158±7
	Fe 185±10	194±20
Citrus Leaves	Cu 14.9±0.6	16.5±1
	Fe 84.0±3.0	90.0±10
Human Serum	Cu 127±11 [†]	142±20 [†]
	Fe 179±8 [†]	174±18 [†]

[†] Recommended value ($\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$)

倍量含まれていても定量を妨害しなかった。生体中に含まれるアスコルビン酸は 10 倍量，ヘモグロビンは 100 倍量共存しても影響しなかった。これから，本法は生体物質中の Cu 及び Fe の定量に十分使用できるものと考えられる。

3・7 標準試料物質の分析

本法の有用性を検討するため生体試料をの Cu と Fe の定量を行った。NBS 標準試料 Bovine Liver (SRM 1577a) 及び Citrus Leaves (SRM 1573) の場合には，それぞれ 1 及び 2 g を採取し，前処理操作後そのうち 1 回の分析では 10 及び 25 mg に相当する試料について Cu 及び Fe を定量した。又，ヒト血清の分析では，前処理した溶液を採り 2・3・1 の中でトリクロロ酢酸を加える操作を省略して定量を行った。いずれも 7 回の繰り返し実験を行い，求めた分析値を Table 1 に示す。これから，Fe の定量値は保証値及び標示値（ヒト血清では和光純薬工業が提示している値）とほぼ一致していることが分かる。一方，Cu の定量値についてみると，Bovine Liver では保証値に一致するが，Citrus Leaves では保証値よりやや低い値となった。又，ヒト血清でも Cu の定量値が標示値より小さいが，いずれも許容できる範囲にありほぼ満足できる結果と言える。

文 献

- 1) 太田次郎，竹内敬人，室伏きみ子訳：“生体無機化学”，p. 183 (1986)，(オーム社)。
- 2) 木村修一：ぶんせき，**1989**，38。
- 3) 牧野鉄男：ぶんせき，**1980**，392。
- 4) 前畑英助：“改訂臨床化学”，p. 223 (1984)，(講談社サイエンティフィク)。
- 5) 日本分析化学会編：“分析化学便覧(改訂二版)”，p. 1359 (1971)，(丸善)。
- 6) 松原高賢：日本血液学会雑誌，**24**，434 (1961)。
- 7) 奥田 稔：“臨床化学検査”，II，石井 暢編，p. 306 (1980)，(医学書院)。

- 8) 小辻奎也，畑中和美，林 滋彦：分析化学，**33**，134 (1984)。
- 8) 鈴木周一編：“イオン電極と酵素電極”，p. 185 (1986)，(講談社サイエンティフィク)。
- 10) 相澤益男：ぶんせき，**1989**，346。
- 11) Y. Nagaosa: *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **316**, 794 (1983)。
- 12) 永長幸雄，小野正人：分析化学，**36**，735 (1987)。
- 13) Y. Nagaosa: *Anal. Sci.*, **4**，429 (1988)。
- 14) J. Wang, D. B. Luo, B. Freiha: *Talanta*, **33**，397 (1986)。

☆

Simultaneous determination of copper and iron in biological samples by differential pulse polarography following gas-stirred solvent extraction. Yukio NAGAOSA and Yukihiro OHTANI (Faculty of Engineering, Fukui University, 3-9-1 Bunkyo, Fukui-shi, Fukui 910)

A differential pulse polarographic method was developed for the simultaneous determination of Cu(II) and Fe(III) after extraction of their *N*-benzoyl-*N*-phenylhydroxylamine complexes (BPA) into 1:3 ethyl acetate-acetonitrile. Into a polarographic cell, an aqueous sample solution is taken with 2.0 cm³ of 3 mol dm⁻³ sodium acetate solution, 0.5 cm³ of 20% (w/v) trichloroacetic acid solution and then water to make up a total volume of 4.0 cm³ in a polarographic cell. As the organic solvent, 2.0 cm³ of 1:3 ethyl acetate-acetonitrile solution containing 0.05 mol dm⁻³ BPA and 0.1 mol dm⁻³ tetrabutylammonium perchlorate is added to the aqueous solution. The extraction is performed by passing nitrogen through the two phases at a flow rate of ca. 60 cm³ min⁻¹ for 7 min. The differential pulse polarogram is measured in the organic phase under the following conditions: 10 mV s⁻¹ scan rate; 1 s drop time; 50 mV modulation amplitude; 20±0.1°C temperature. The three electrode systems comprise a dropping mercury working electrode, a silver/silver chloride (Ag/AgCl, 3 M KCl) reference electrode and a platinum counter electrode. Two well-defined differential pulse polarographic peaks appear at -0.25 V for Cu(II) and at -0.48 V vs. Ag/AgCl for Fe(III), respectively. The peak heights are directly proportional to the metal concentration in the range of 0.05~2.0 $\mu\text{g cm}^{-3}$. The lower limit of detection is 0.02 $\mu\text{g cm}^{-3}$ Cu(II) and Fe(III) in the original aqueous phase. The method can be applied to the determination of the two metals in biological materials (Bovine Liver, Citrus Leaves and Human Serum).

(Received June 16, 1989)

Keyword phrases

simultaneous determination of Cu and Fe in biological materials; differential pulse polarography in organic solvent; gas-stirred solvent extraction with ethyl acetate-acetonitrile mixture.