

技術論文

$\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -テトラキス(4-スルホナトフェニル)ポルフィンを用いる 血清中の銅(II)の吸光検出フローインジェクション分析法

足立 弘明*, 五十嵐淑郎^{®**}, 四ツ柳隆夫*

(1995 年 5 月 18 日受付)

(1995 年 6 月 19 日審査終了)

$\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -テトラキス(4-スルホナトフェニル)ポルフィンを用いて 10^{-6} mol dm⁻³ レベルの銅(II) イオンの FIA 法を開発した. TPPS-銅(II) 錯体の吸収スペクトルは, 413 nm に吸収極大を有し, そのモル吸光係数は, 4.76×10^5 mol⁻¹ dm³ cm⁻¹ である. L-アスコルビン酸共存下, TPPS と銅(II) イオンは室温で 1 分間以内に定量的に錯体を生成した. 共存イオンとして 14 種類の金属イオンの妨害の有無を検討した結果, 血清中の存在量レベルで銅(II) の定量を妨害するものはなかった. 本 FIA は, 少なくとも 1 時間に 18 試料を定量できる {相対標準偏差: 1.6% (5 回測定)}. 除タンパク後のイヌ及びヒトの標準血清試料に対し, 本法を応用した.

1 緒 言

フローインジェクション分析法 (FIA) は迅速, 簡便かつ高精度な分析法であり, 多数の試料処理に適合した手法である. このため, 臨床検査における応用も広く行われている. その中で, 血清中の銅の定量に FIA を用いた例も多く, 高感度比色試薬としては, アゾ化合物の 4-(3,5-ジブromo-2-ピリジルアゾ)-N-(3-スルホプロピル)アニリン {銅錯体のモル吸光係数 (ϵ /mol⁻¹ dm³ cm⁻¹, 以下単位省略) は 1.24×10^5 } などが用いられている¹⁾.

一方, 水溶性ポルフィリンの ϵ は $(1.6 \sim 7.1) \times 10^5$ であり, これまで $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -テトラキス(1-メチルピリジニウム-4-イル)ポルフィン (TMPyP, 銅錯体の ϵ : 2.3×10^5) 及び $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -テトラキス(4-N-トリメチルアミノフェニル)ポルフィン (TTMAPP, 銅錯体の ϵ : 3.8×10^5) が, 血清中の銅の定量に応用されてきた²⁾³⁾. しかし, これらの試薬を FIA に応用した報告はまだない. これは, TMPyP, TTMAPP 等の陽イオン性ポルフィリンがガラス等の器壁に吸着する性質を持つため, ガラスのフローセルを用いる吸光検出 FIA への導入が困難なためと考えられる. そこで, 本論文では TTMAPP

と同程度の感度を持ち, ガラス壁へほとんど吸着しない $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -テトラキス(4-スルホナトフェニル)ポルフィン (TPPS, 銅錯体の ϵ : 4.76×10^5) を選択し, 血清中の銅(II) の吸光検出 FIA を確立したので報告する.

2 実 験

2.1 試 薬

TPPS 水溶液: TPPS の合成及び 10^{-4} mol dm⁻³ 水溶液の調製は既報⁴⁾に準拠した. 銅(II) 水溶液: 市販の特級品の硫酸銅を少量の濃硫酸と共に蒸留水に溶かし, EDTA によるキレート滴定⁵⁾で標定したものを順次希釈して使用した. その他の試薬は, 特に断らない限り, 市販の特級品をそのまま使用した.

2.2 装 置

吸光度の測定には, 日立 200-10 型分光光度計を用いた. pH の測定には, 堀場製作所製 F-8AT 型 pH メーターにガラス複合電極を装着して使用した. 原子吸光度計は, 日立製作所製 180-80 型偏光ゼーマン原子吸光度計を使用した. 遠心分離機には, 日立 05P-21 型遠心分離機を使用した.

2.3 フローインジェクション分析装置

Fig. 1 に本研究において使用したフローインジェクションシステムを示す. フローインジェクションを構成す

* 東北大学工学部分子化学工学科: 980-77 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉

** 茨城大学工学部物質工学科: 316 茨城県日立市中成沢町 4-12-1

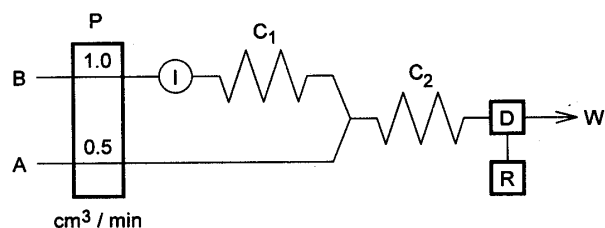


Fig. 1 Flow injection system

A: chloroacetic acid solution (1 mol dm^{-3}); B: TPPS ($1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) solution containing ammonium acetate buffer (0.1 mol dm^{-3} , pH 6.0) and L-ascorbic acid ($1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); C₁: mixing coil ($1 \text{ mm}\phi \times 50 \text{ cm}$); C₂: Mixing coil ($1 \text{ mm}\phi \times 45 \text{ cm}$); D: detector (cell vol. $8 \mu\text{l}$, light path 10 mm , 413 nm); I: injector ($50 \mu\text{l}$); P: pump; R: recorder; W: waste

る主なパーツについて以下に記述する。ポンプ: 日本分光製 RP-4F 型 FIU High Pressure Recipro Pump に同社製 DU-4F 型 FIU Dumper Unit を組み合わせて使用した。インジェクター: Rheodyne Teflon Valve Type-50 に、50, 100, 250 及び $500 \mu\text{l}$ のループインジェクターを組み合わせて使用した。吸光検出器: 日本分光製 UVIDEK-100-VI 型紫外可視分光検出器を使用した。

2.4 血清の除タンパク操作

血清 0.2 cm^3 をビーカーに採り、これに $2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ L-アスコルビン酸を含む 1 mol dm^{-3} 塩酸水溶液 0.1 cm^3 を加え混合し 5 分間静置する。これに 1.2 mol dm^{-3} トリクロロ酢酸水溶液 0.1 cm^3 を加えた後、遠心分離 (2000 rpm, 5 分間) して、汙過する。汙過の際には、東洋曹達工業製 TOYOPACK ODS 前処理用ディスクポザブルユニットを用いた。汙液 0.1 cm^3 をビーカーに採り pH 6.0 の 1 mol dm^{-3} 酢酸アンモニウム緩衝液 0.1 cm^3 を加え混合した後、 $50 \mu\text{l}$ を FIA システムに注入する。

3 結果及び考察

3.1 吸収スペクトル

TPPS 及びその銅(II) 錯体の可視部における吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。TPPS 及びその銅(II) 錯体の吸収極大波長 (λ_{max}) は、反応系の pH が 6.0 において共に 413 nm に存在した。この試薬と銅(II) 錯体の λ_{max} の一致は、他の水溶性ポルフィリンの場合でも同様に観測されている。分析法の設計の立場から、現在ま

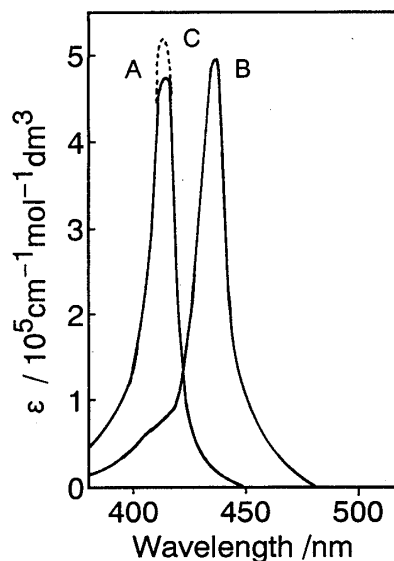


Fig. 2 Absorption spectra of TPPS and its copper complex

A: Cu-TPPS complex (pH 2.5 and pH 6.0); B: TPPS (pH 2.5); C: TPPS (pH 6.0)

で、幾つかのスペクトルシフト法が開発されてきた⁶⁾。本研究では、錯体を形成した後、酸を添加して遊離の試薬の λ_{max} を 434 nm にシフトさせる方法を選択した。

3.2 錯形成反応

TPPS と銅(II) は、pH 4.0 で沸騰水浴上加熱 1 分間で定量的に反応した。この反応条件を用いて FIA システムを設計する場合、加熱装置を必要とするためシステムを複雑にする。従って、反応促進剤を用いて室温で迅速に反応する条件を検討した。主な反応促進剤は、還元剤としての機能を持つ化合物である⁷⁾。

Fig. 3 に L-アスコルビン酸、ヒドロキシルアミン、及び L-システインの TPPS と銅(II) との錯形成反応に及ぼす効果について検討した結果を示す。pH 6.0 及び室温で反応時間 1 分間を目安として、錯体形成率を測定した。L-システインは、TMPyP 及び TTMAPP と銅(II) の反応促進剤として働くが、ここで検討した TPPS と銅(II) の反応は、促進しなかった。反応促進効果におけるヒドロキシルアミンの濃度依存性については、TMPyP 及び TTMAPP の場合に観測されているが、TPPS の場合でも著しい濃度依存性が認められた。L-アスコルビン酸は $10^{-4} \sim 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$ という広い濃度範囲において良好な反応促進効果を示したので、本吸光検出 FIA では、L-アスコルビン酸を選択して使用した。

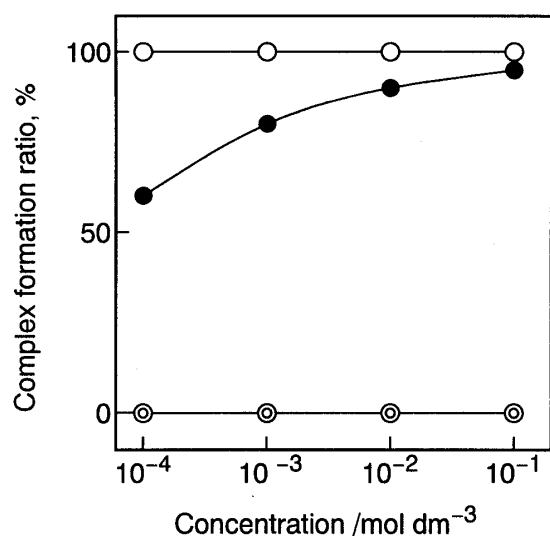


Fig. 3 Comparison of three kinds of reducing agent as accelerators of Cu-TPPS system

○: L-ascorbic acid, ●: hydroxylamine, ○: L-cysteine, $[\text{Cu}^{2+}] = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{TPPS}] = 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$; Room temp., Reaction time: 1 min; pH 6.0

3.3 フローインジェクション分析法への応用

本研究では, 2 流路方式の FIA システムを選択した (Fig. 1). なお, 3 流路方式の FIA システム {① TPPS 水溶液 ($10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), ② L-アスコルビン酸 ($10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) を含む酢酸アンモニウム水溶液 (0.1 mol dm^{-3} , pH=6.0), ③ モノクロロ酢酸水溶液 (1 mol dm^{-3}) から構成されている} も同様に設計し検討を行ったが, 流路の増加に伴う各水溶液の分散のために, 感度は著しく減少した. 又, 検出波長については, 434 nm と 413 nm が考えられるが, 434 nm ではベースラインの変動が非常に大きく検出下限がより高濃度レベルになった. 本システムでは, 413 nm を採用した.

混合コイルの長さの最適化を検討した. 内径 1 mm, 長さ 50 cm のコイルを錯体形成用を使用し, 内径 1 mm, 長さ 45 cm のコイルを遊離の試薬のスペクトルシフト用を使用した場合, 相対標準偏差は 0.2% で安定した応答信号が得られた. 試料の注入量を 50, 100, 250 及び 500 μl のループインジェクターを用いてその効果を検討した. 100 μl 以上の注入量では良好な混合が行われないため, 応答信号に分裂が生じた. この結果に基づき, 50 μl のループインジェクターを使用することにした.

Fig. 1 のシステムによって得られた FIA 応答曲線を

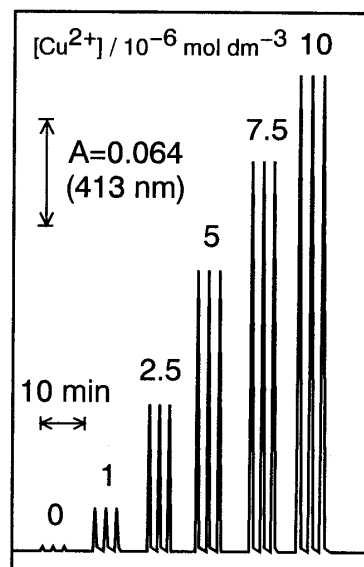


Fig. 4 FIA response curve for copper(II) ion

Fig. 4 に示す. $0 \sim 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ の銅(II) に対して良好な直線となる検量線が得られた. 5 回繰り返し測定 of 相対標準偏差は, 銅(II) の標準溶液を用いた場合, 1.6% であった ($[\text{Cu}^{2+}] = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$).

3.4 共存イオンの影響

$6 \mu\text{g}/20 \text{ cm}^3$ の銅(II) を含む試料に対して他の 14 種類の金属イオンを $1000 \mu\text{g}/20 \text{ cm}^3$ 共存させ, 本法で定量した. ここでは $\pm 5\%$ の吸光度変化を許容限界とし, その影響の有無を検討した. 血清等の実試料においてナトリウム(I) 及びカリウム(I) は, 遷移金属イオンに対して通常は多量に存在する. これらをそれぞれ $10000 \mu\text{g}/20 \text{ cm}^3$ (重量濃度比で 1700 倍) 共存させて検討した結果, 銅(II) の定量に影響を与えなかった. カルシウム(II), コバルト(II), 鉄(II), 鉄(III), 水銀(II), マグネシウム(II), マンガン(II), ニッケル(II) 及び鉛(II) は $1000 \mu\text{g}/20 \text{ cm}^3$ (重量濃度比で 170 倍) まで許容された. アルミニウム(III) 及びカドミウム(II) は, $100 \mu\text{g}/20 \text{ cm}^3$ {銅(II) に対して重量濃度比で 17 倍} までしか許容されなかった. この両者の金属イオンは, 通常健康体の血清中では銅(II) に対してより低濃度レベルでしか存在しない. 又, 鉄(II, III) 及び亜鉛(II) は, 血清中に銅と同じ濃度レベルで存在する. 血清中の銅を測定する際, 用いる試薬には鉄及び亜鉛に対する選択性が特に要求される. 本法においては鉄(II) 及び亜鉛(II) はそれぞれ 1000 及び $600 \mu\text{g}/20 \text{ cm}^3$ (重量濃度比でそれぞれ 170 及び 100 倍) まで許容された.

Table 1 Determination of copper(II) ion in dog serum

Method	Value, ppm
AAS (flame) ^{a)}	0.5
AAS (flame) ^{b)}	0.52±0.04
FIA ^{b)}	0.51±0.01

a) The serum sample was not deproteinized. b) The serum sample was deproteinized.

Table 2 Determination of copper(II) ion in NIES^{a)} No. 4 "Freeze-dried Serum" standard

Certified value ^{b)}	Found by AAS (flame) ^{c)}	Found by FIA ^{c)d)}
1.07±0.09 ppm	0.98±0.07 ppm	1.01±0.03 ppm

a) NIES: National Institute for Environmental Studies (Japan). b) The serum sample was not deproteinized (AAS and ICP etc.). c) This serum sample was deproteinized. d) This method (FIA)

3・5 血清中の銅の定量

試料血清としては、イヌの血清及びヒトの血清 {国立公害研究所 (NIES) 作成の標準試料 NIES No. 4} を使用した。測定結果を Table 1 及び Table 2 に示す。イヌの血清を用いて除タンパク操作前後における銅の濃度を原子吸光法 (AAS) で測定した結果、銅が有効にタンパクから分離されていることが分かった。イヌ及びヒトの血清中の銅の定量結果は、AAS で測定した値及び保証

値と本法での測定値は良好に一致した。イヌの血清を用いて 2・4 節の操作に従い、6 回繰り返し測定における相対標準偏差は、本法で 2.6%, フレーム AAS で 7.5% と本法の精度はフレーム AAS より優れていた。

4 結 論

本法は有機試薬を用いて血清中の銅を定量する方法としては最も高感度な方法である。臨床検査における試料必要量の微小化は、今日最も強く望まれている事項の一つであるが、従来の FIA 法では、1 回の測定に 100 μ l の試料の注入が必要であった。本 FIA での注入量は 1 回 50 μ l であり、更に予備的な検討の結果では、20 μ l までの試料の微小化が可能であった。又、水溶性ポルフィリンを HPLC に応用して血清中の銅を定量することも可能であるが、血清中の銅 (II) 濃度レベルに対して TPPS は良好な選択性をもつため、簡便性及び迅速性の観点から本 FIA 法が有利であると言える。

文 献

- 1) T. Makino, H. Wada, G. Nakagawa: *Anal. Chim. Acta*, **176**, 41 (1985).
- 2) 牧野鉄男, 伊藤純一: 臨床化学, **8**, 266 (1979).
- 3) T. Makino, J. Itoh: *Clin. Chim. Acta*, **111**, 1 (1981).
- 4) S. Igarashi, T. Yotsuyanagi: *Anal. Chim. Acta*, **281**, 347 (1993).
- 5) 上野景平: "キレート滴定法", p. 250 (1964), (丸善).
- 6) 五十嵐淑郎: 化学と工業, **41**, 258 (1988).
- 7) K. Ueno, T. Imamura, K. L. Chang: "*Handbook of Organic Analytical Reagents*", 2nd Ed., p. 424 (1992), (CRC Press, Boca Raton).



Determination of copper(II) in serum with $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -tetrakis(4-sulfonatophenyl)-porphine by FIA with spectrophotometric detection. Hiroaki ADACHI*, Shukuro IGARASHI** and Takao YOTSUYANAGI* (*Department of Molecular Engineering, Faculty of Engineering, Tohoku University, Aramaki-aza-aoba, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 980-77; **Department of Materials Science, Faculty of Engineering, Ibaraki University, 4-12-1, Nakanarusawa, Hitachi-shi, Ibaraki 316)

A copper(II)- $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphine (TPPS) complex had an absorption maximum wavelength of the Soret band at 413 nm (molar absorptivity: $4.76 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$). Also, in the presence of L-ascorbic acid as a reaction accelerator, the copper(II) ion quantitatively formed a stable complex with TPPS within one minute at room temperature. Based on these results, the spectrophotometric detection-FIA system of copper(II) determination in serum was developed. The proposed FIA is a double-line manifold system consisting of a line for spectral shift and one for complex formation. Recommended procedure: A 0.2 cm^3 serum sample is placed in

a beaker. A 0.1 cm^3 aliquot of 1 mol dm^{-3} hydrochloric acid aqueous solution is added and then mixed. After standing for 5 min at room temperature, 0.1 cm^3 of a 1.2 mol dm^{-3} trichloroacetic acid aqueous solution is added to this mixture and centrifuged (2000 rpm, 5 min). After filtering, 0.1 cm^3 of 1 mol dm^{-3} ammonium acetic acid buffer solution is then added to 0.1 cm^3 of the filtrate. Fifty μl of the mixture solution is injected into the FIA system. At least eighteen samples can be determined within one hour (the RSD: 1.6% (5 determinations)). This method was applied to dog and human serum with satisfactory results.

(Received May 18, 1995)

(Accepted June 19, 1995)

Keywords

copper(II) ion in serum; water-soluble porphyrin; $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphine; FIA; highly sensitive absorption detection.
