

2-(5-ブロモ-2-ピリジルアゾ)-5-(N-プロ  
ピル-N-スルホプロピルアミノ)アニリ  
ンのフローインジェクション分析システ  
ムへの利用

— 血清銅及び鉄の定量と病態診断 —

大野典子\*, 酒井博淳\*, 中村勝彦\*, 井田和徳\*\*, 酒井忠雄\*

\*朝日大学教養部化学教室

\*\*朝日大学歯学部内科学教室

501-02岐阜県本巣郡穂積町穂積1851

Utilization of 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-sulfopropylamino)-  
aniline to simple flow injection analysis system

— Determination of serum copper and iron and its application  
to disease diagnosis —

Noriko OHNO\*, Hiroatsu SAKAI\*, Katsuhiko NAKAMURA\*,  
Kazunori IDA\*\*, Tadao SAKAI\*

\*Department of Chemistry, Asahi University

\*\*Department of Internal Medicine, Asahi University

1851 Hozumi, Hozumi-cho, Motosu-gun, Gifu 501-02

Flow injection-spectrophotometric determination of copper was inves-  
tigated. Copper reacted with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-  
sulfopropylamino)aniline(5-Br-PSAA) at pH 4.5 to form a red complex.  
Molar absorptivity of the complex was  $65000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 578 nm.  
Copper in the range of 10 - 100 ppb could be determined by a simple flow  
injection system. The sample throughput was  $60 \text{ h}^{-1}$  with a precision of  
0.7%. Moreover, simultaneous determination of copper and iron with 5-Br-  
PSAA was developed using a double-flow cell to analyse patient sera.

## 1. 緒言

古くから銅の比色試薬としてクプロイン類が使用されているが、モル吸光係数は約7000と小さい。そこで種々の溶媒抽出法が高感度化を計る目的で検討された。例えば、シップ塩基と銅の化合物をクロロホルムに抽出する方法<sup>1)</sup>、Cu-エリオクロムシアニンR-四級アンモニウム塩の三元錯体を抽出する方法<sup>2)</sup>などが報告され、3-7万のモル吸光係数を得た。又著者らは、Cu-クプロイン錯体と一塩基酸色素テトラプロモフェノールフタレインエチルエステル(TBPE)との会合体を抽出し、モル吸光係数 9.4万の高感度定量法を報告した。<sup>3)</sup> 一方鉄は 3-(2-ピリジル)-5,6-ジフェニル-1,2,4-トリアジン(PDT)と安定な錯陽イオンを形成するため、銅の場合と同様にTBPEを対イオンとすると、1:2の錯体[Fe(PDT)<sub>3</sub>](TBPE)<sub>2</sub>が形成され、19万のモル吸光係数が得られた。<sup>4)</sup> しかし溶媒抽出法は操作がやや煩雑となるため、抽出操作を省く目的で、水溶性の高感度試薬が開発され、堀口らは2-ニトロソ-5-(N-プロピル-N-スルホプロピルアミノ)フェノール(ニトロソ-PSAP)<sup>5)</sup>、2-(5-プロモ-2-ピリジルアゾ)-5-(N-プロピル-N-スルホプロピルアミノ)フェノール(5-Br-PAPS)<sup>6)</sup>、2-(5-プロモ-2-ピリジルアゾ)-5-(N-プロピル-N-スルホプロピルアミノ)アニリン(5-Br-PSAA)<sup>7)</sup>を、和田らは2-(2-チアゾリルアゾ)-4-メチル-5-スルホメチルアミノ安息香酸(TAMSMB)<sup>8)</sup>を報告した。これらの試薬はフローインジェクション分析(FIA)に適し、753 nmの吸光度測定によるニトロソ-PSAPを用いた鉄の選択的定量<sup>9)</sup>、又 5-Br-PSAAが強酸性溶液中でパラジウムのみと錯形成することからパラジウムの高感度定量<sup>10)</sup>が報告されている。ニトロソ-PSAP等のニトロソ化合物は鉄に対しては750nm付近に特異的ピークを示すが、銅、ニッケル、コバルト錯体や鉄錯体の短波長側のピークは400 nm付近に存在し、それらのスペクトルは試薬ブランクの吸収と重なり、又感度も低い。従ってニトロソ化合物を用いるこれらの金属の分別定量は難しい。それに対し 5-Br-PSAAは銅と鉄のスペクトルが578 nmと558 nmで少しずれ、又反応速度にも差があることから分別が可能でニトロソ化合物よりも有用と思われる。銅は 5-Br-PSAAとモル吸光係数の大きなキレート化合物( $\epsilon = 65000$ )を生成し、この反応系をFIAに導入したところ、検出限界 1 ppb、変動係数0.7%の高感度で再現性の良い結果が得られた。一方5-Br-PSAAによる鉄の定量については既に報告されている。<sup>11)</sup>

銅のFIA法には、接触反応を利用する方法<sup>12)</sup>、大環状シップ塩基を用いる方法<sup>13)</sup>などが報告されているが、定量範囲は0.2-2 ppmとあまり高感度ではなく、

再現性も悪い。和田らは銅に対して選択性のあるTAMSMBを用いて除タンパクの前処理を行うことなく血清中の銅の定量を試み良好な結果を得ている。<sup>14)</sup> 著者らは銅と鉄の同時定量法を開発する目的で5-Br-PSAAによる銅の定量条件と実用性について検討した。更に疾病患者血清中の銅と鉄について、既に報告したダブルフローセル<sup>15)</sup>を用いて同時定量を試み良好な結果を得、臨床化学的に応用が可能である知見を得たので報告する。

## 2. 実験

### 2. 1. 試薬

銅(II)標準溶液：塩化銅(II)・二水和物(半井化学製)0.2683 gを0.1 M塩酸100 mlに溶かし1000 ppm溶液とした。EDTA滴定により正確に濃度を標定した。使用に際し適宜希釈し、0.1 M塩酸溶液として用いた。

鉄(II)標準溶液：硫酸第一鉄アンモニウム・六水和物(半井化学製)0.7022 gを0.1 M塩酸100 mlに溶かし1000 ppm溶液とした。EDTA滴定により正確に濃度を標定した。

5-Br-PSAA溶液：2-(5-プロモ-2-ピリジルアゾ)-5-(N-プロピル-N-スルホプロピルアミノ)アニリンナトリウム塩(ドータイト製)0.0478 gを水に溶かして100 mlとし $1 \times 10^{-3}$  M溶液を調製し、適宜水で希釈して使用した。

緩衝溶液：0.1 M酢酸ナトリウムと0.1 M酢酸の混合溶液に1 M硫酸または水酸化ナトリウム溶液を加えてpHを調節した。

除タンパク剤：10 gのトリクロロ酢酸を水に溶かし、これに濃塩酸8.3 mlと水を加え全量を100 mlとした。

その他の試薬は市販の特級を使用した。

### 2. 2. 装置及び標準操作

#### 2. 2. 1. バッチ法

吸収スペクトル及び吸光度の測定には島津製UV-365形分光光度計を使用した。セルは光路長10 mmの石英セルを使用した。pHの測定には東亜電波工業製pHメーターを用いた。

5 ppmの銅(II)標準溶液1-5 mlをメスフラスコに採り、 $1 \times 10^{-3}$  M 5-Br-

PSAA溶液 2 ml, pH 4.5 の緩衝溶液 5 ml を加える。これに水を加え 25 ml とし、よく混合した後 578 nm における吸光度を測定する。

### 2. 2. 2. FIA法

フローシステムを Fig. 1 に示す。キャリアー溶液として 0.1M 塩酸溶液、試薬溶液として  $5 \times 10^{-5}$  M 5-Br-PSAA 溶液を、0.9 ml/min の流量で、pH 4.5 の緩衝溶液を 0.5 ml/min の流量で流した。ポンプはサヌキ工業製 DM2U-1026 型ダブルプランジャーポンプを使用した。試料 (10-100ppb, 120  $\mu$ l) を六方切り替えバルブインジェクター (デッドボリューム 80  $\mu$ l) により注入し、反応生成物の吸光度を 578nm で測定した。相馬光学製 S-3250 型検出器及び東亜電波工業製 FBR-251A 型記録計を使用した。セルは光路長 10mm, 容量 8  $\mu$ l のフローセルを用いた。流路は全て内径 0.5mm のテフロンチューブを用いた。気泡の発生を防ぐために内径 0.25mm, 長さ 2m

のバックプレッシャーコイルを接続した。

二流路と三流路で比較検討したが、分析時間、ピーク高さ等両流路とも差がみられなかった。そこで本システムは三流路系を用いたが、単純な二流路系でも同一条件で利用可能である。

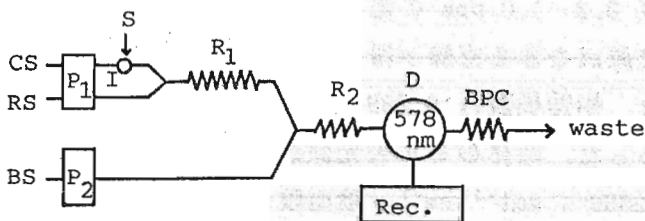


Fig. 1 Flow diagram for the determination of copper

P : pump (flow rate,  $P_1$  0.9 ml/min,  $P_2$  0.5 ml/min), I : six-way valve sample injector, R : reaction coil ( $R_1$  1.5 m,  $R_2$  1.0 m), BPC : back-pressure coil, D : spectrophotometer, Rec. : recorder, CS : 0.1 M HCl, RS :  $5 \times 10^{-5}$  M 5-Br-PSAA, BS : buffer solution (pH 4.5).

### 3. 結果と考察

#### 3. 1. Cu-5-Br-PSAA キレートの特性

Fig. 2 に Cu(II)-5-Br-PSAA キレートの吸収スペクトルを示す。曲線(1) は水を対照とした 5-Br-PSAA の吸収スペクトルであり、極大吸収を 450 nm に示す。曲線(2) は試薬空試験液を対照とした Cu(II)-5-Br-PSAA キレートの吸収スペク

トルを示し、555 nm付近にショルダーを、578 nmに極大吸収を持つ。従って測定は578 nmで行われた。

キレート生成の最適pH領域はpH 4-6であった。pH6以上では、Cuの加水分解のためキレート生成が抑制され吸光度は減少した。そこで、pH4.5で実験を行った。

バッチ法において、銅濃度 0.2-1.0 ppm の範囲で原点を通る直線が得られ、相関係数は 0.999であった。錯体のモル吸光係数は  $65000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、検出限界(S/N = 3)7 ppbが得られ、10回の繰り返し実験より求めた変動係数は0.8%であった。又呈色も安定で3時間経過後も吸光度に変化はみられなかった。

Cu(II)-5-Br-PSAA キレート組成を連続変化法及び傾斜比法で検討した。傾斜比法の結果をFig. 3に示す。Fig. 3より、傾き1の直線が得られ1:1の組成であることがわかり、この結果は連続変化法の結果と一致した。又傾斜比法より求めた生成定数(log K)は 6.7であった。

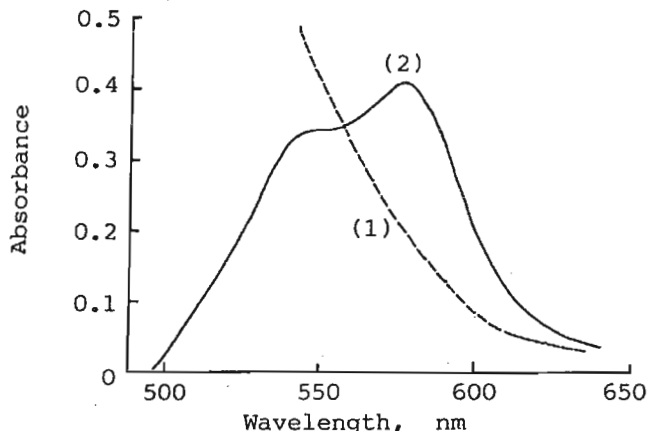


Fig. 2 Absorption spectra of Cu(II)-5-Br-PSAA complex

0.4 ppm Cu(II),  $8 \times 10^{-5} \text{ M}$  5-Br-PSAA, pH 4.5, Reference : (1) water, (2) reagent blank.

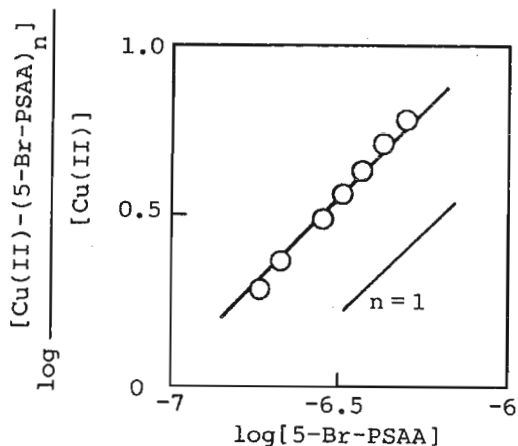


Fig. 3 Logarithmic plots  
[Cu(II)]<sub>i</sub> =  $6.3 \times 10^{-6} \text{ M}$ , pH : 4.5, Wavelength : 578 nm.

### 3. 2. FIAによる反応条件の検討

緩衝溶液のpHを3.5-7.5まで変化させピーク高さに及ぼす影響を検討した。その結果pH 4-6 の範囲で最大のピーク高さが得られ、バッチ法の結果と一致した。本実験では緩衝溶液のpHを4.5に調節して行った。

40 ppb Cu(II)溶液に対し、5-Br-PSAA 溶液の濃度の影響を検討したところ、 $3 \times 10^{-5}$  M以上で一定のピーク高さが得られた。ベースラインのノイズレベルが高くなること、試薬の消費量が増すこと等から試薬濃度は余り高くない方がよい。本実験では  $5 \times 10^{-5}$  M 溶液を用いた。

Feについては既に報告した<sup>11)</sup>が、同様の三流路システムで定量でき、キャリアー溶液は  $1 \times 10^{-3}$  Mアスコルビン酸溶液、試薬溶液は  $2.5 \times 10^{-4}$  M 5-Br-PSAA 溶液が使用された。緩衝溶液のpHは4.5、測定波長は713 nmである。

### 3. 3. 反応コイルの長さの検討

反応コイルの長さはピークの高さ、形状及び分析速度に影響を及ぼす。そこで反応コイル  $R_1$ 、 $R_2$  の長さを種々変えてその影響を検討した。 $R_1$  の長さを一定( $R_1 = 1.5$  m)として  $R_2$  の長さを0.5-3 mまで変化させた時のピークの形状を Fig.4 に示す。コイル長 1 mの時最も高いピークが得られた。0.5 mの短いコイルでは緩衝溶液との混合が不完全であるため低いピークが、又 2 m以上の長いコイルでは拡散が大きくなり幅広く低いピークが得られた。

次に  $R_2$  を1.0 mと一定にして  $R_1$  の長さを 0.5-3.5 m の範囲で種々変化させた。その結果をFig. 5に示す。コイル  $R_1$  において試料は試薬と混合されると同時に拡散も起こっている。

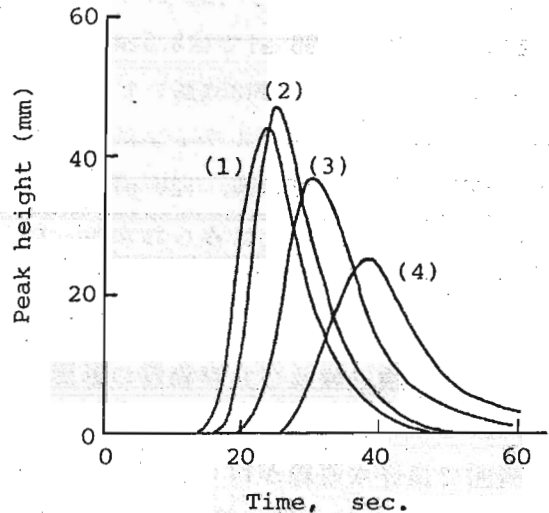


Fig. 4 Effect of the length of  $R_2$  coil

$R_2$  coil : (1) 0.5 m, (2) 1 m,  
(3) 2 m, (4) 3 m;

$R_1$  coil : 1.5 m, Cu(II) : 50 ppb,  
120  $\mu$ l, pH 4.5.

コイルが短いと混合は不十分であるが拡散が小さいため高いピークが得られた(曲線(1))。又長い場合よく混合されるが拡散が大きくなることから、幅広いピークが得られた(曲線(4)(5))。本実験では  $R_1 = 1.5 \text{ m}$ ,  $R_2 = 1.0 \text{ m}$  とした。

### 3. 4. 試薬の注入量の検討

試薬の注入は六方切り替えバルブインジェクターにより行い、接続するループの長さによって注入量を調節した。90  $\mu\text{l}$  と 120  $\mu\text{l}$  で比較したところ、90  $\mu\text{l}$  では3.5cm, 120  $\mu\text{l}$  では 4.7 cmと約35%高いピークが得られた。ベースラインに戻る時間は 90  $\mu\text{l}$  で44秒, 120  $\mu\text{l}$  で48秒と余り大きな差はみられなかった。従って本実験では120 $\mu\text{l}$ を注入することとした。

### 3. 5. 検量線及び共存物質の影響

Fig. 6 にフローシグナルを示す。10-100ppbの範囲で良好な直線が得られた。変動係数0.7%,  $S/N = 3$ とした時の検出限界は1ppb, 1時間当りの試料処理数は60であった。

50 ppb Cu(II)に種々のイオンを共存させ、ピーク高さに及ぼす影響を検討した(Table 1)。各種陰イオン及び Ca, Mg等は100 ppm (Cuの200倍量), Cd, Alは 10 ppm (Cuの 20倍量) 共存しても全く妨害を与えなかった。Fe(II), Ni, Coは 5-Br-PSAA とキレートを生成するため微量存

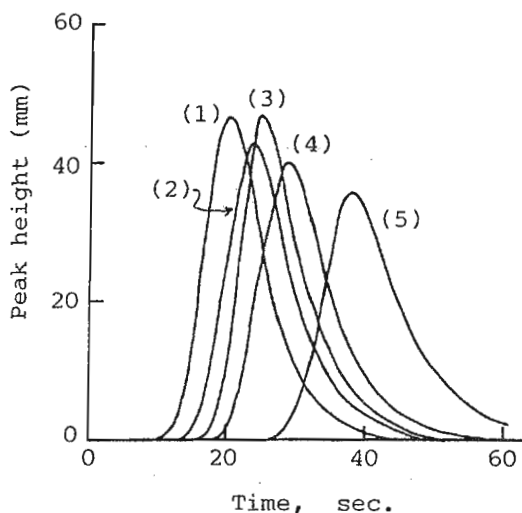


Fig. 5 Effect of the length of  $R_1$  coil

$R_1$  coil : (1) 0.5 m, (2) 1 m, (3) 1.5 m, (4) 2 m, (5) 3.5 m;  
 $R_2$  coil : 1 m, Cu(II) : 50 ppb, 120  $\mu\text{l}$ , pH 4.5.

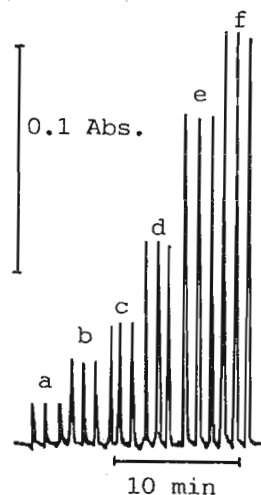


Fig. 6 Flow signals  
 Cu(II) concentration :  
 a 10, b 20, c 30, d 50, e 80, f 100 ppb.

在しても正の誤差を与える。許容限界濃度は Ni: 0.1 ppm, Fe(II): 0.05 ppm, Co: 0.01ppmであった。Fe(II)は $IO_4^-$ を加えてFe(III)に酸化することによって 0.5 ppm (Cuの10倍量) まで共存可能となった。血清中の銅濃度は 0.7-1.6ppmであり、一方血清中に比較的多く存在する金属イオンはCa: 100 ppm, Mg: 36-58 ppm, Al: 0.13-0.17ppm, Zn: 1.2 ppm, Fe: 0.8-1.6ppm, Pb:0.3-0.4ppm

である。<sup>16)</sup> Table 1に示される結果より、血清中のこれらの金属イオンは血清銅の定量に影響を与えないことが分かった。

### 3. 6. 血清中の銅の定量

血清0.5 mlに除タンパク剤0.5 ml加えガラス棒でよく攪はんした後、沸騰水浴中で5分間加熱した。冷却後遠心分離し上澄み液を0.3 ml採り、水1.2 ml加え混合した溶液を試料溶液とし、Fig. 1のフローシステムで銅を測定した。その結果を Table 2に示す。和田らは除タンパクすることなく血清中の銅の定量を試みている<sup>13)</sup>が、本法では各種病態の疾病患者の血清に適用することから、除タンパク前処理後の試料を供した。

Table 1 Tolerance limits of foreign ions in the determination of 50 ppb copper(II)

Tolerance limit (ppm)	Foreign ion
100	$Cl^-$ , $Br^-$ , $NO_3^-$ , $CH_3COO^-$ , $PO_4^{3-}$ , Na(I), K(I), Ca(II), Ba(II), Mg(II)
25	Zn(II)
10	Cd(II), Al(III), Se(IV)
0.5	Fe(II)*
0.1	Ni(II)
0.05	Fe(II)
0.01	Co(II)

\*  $IO_4^-$  (100 ppm) was added to the sample.

Table 2 Determination of copper in sera

Serum	Cu content* (ppm)	
	FIA method	Batchwise method
Human	1.17 ± 0.014	1.15 ± 0.035
Horse	1.04 ± 0.021	1.06 ± 0.010
Goat	0.99 ± 0.007	0.99 ± 0.020
Chicken	0.26 ± 0.003	—

\*Mean values ± S.D. of three determinations.



### 3. 7. 血清中の銅と鉄の同時定量

血清中の銅の増減は様々な疾患と関連がある。例えばウィルソン病、栄養不全等で低値を、感染症、リュウマチ、悪性腫瘍、ヘモクロマトーシス等では高値を示す。同時にこれらの疾患は血清鉄の値とも関連し、ヘモクロマトーシス等で高値を、慢性感染症、悪性腫瘍、貧血等で低値を示す。従って血清中の銅と鉄を同時に簡便迅速に測定することは、診断、治療の上での臨床的意義が深い。5-Br-PSAA

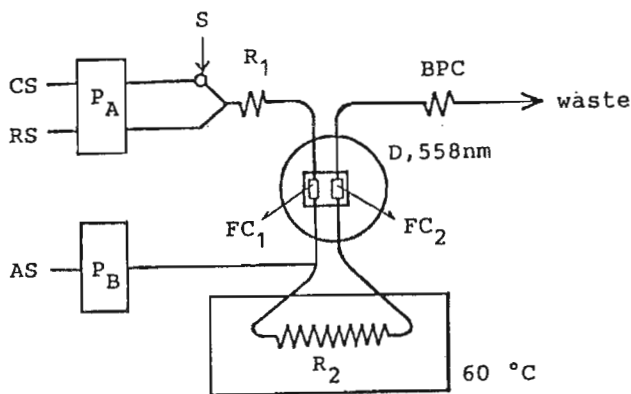


Fig. 7 Schematic flow diagram for simultaneous determination of copper and iron

CS : 0.1 M HCl containing  $1 \times 10^{-4}$  M  $\text{KIO}_4$  ,  
 RS :  $1 \times 10^{-4}$  M 5-Br-PSAA buffered at pH 4.5,  
 AS :  $1 \times 10^{-2}$  M sodium ascorbate (pH 4.5),  
 R : reaction coil ( $R_1 = 15$  cm,  $R_2 = 7.0$  m),  
 $\text{FC}_1, \text{FC}_2$  : double flow cell, BPC : back-pressure coil (0.25 mm i.d. x 2.0 m), D : double-beam detector,  $P_A, P_B$  : pump (flow rate,  $P_A$  0.9 ml/min,  $P_B$  0.25 ml/min).

Table 3 Simultaneous determination of copper and iron in patient sera

Serum sample	Disease*	Contents**, ppm			
		FIA method		ICP/AES	
		Cu	Fe	Cu	Fe
1	EC	$1.86 \pm 0.018$	$1.72 \pm 0.015$	$1.87 \pm 0.038$	$1.72 \pm 0.060$
2	CP	$2.20 \pm 0.031$	$0.52 \pm 0.008$	$2.14 \pm 0.043$	$0.53 \pm 0.016$
3	HCC	$1.24 \pm 0.018$	$0.58 \pm 0.012$	$1.22 \pm 0.035$	$0.61 \pm 0.018$
4	HC	$0.84 \pm 0.004$	$3.01 \pm 0.024$	$0.86 \pm 0.026$	$2.97 \pm 0.059$
5	HC	$0.31 \pm 0.007$	$0.39 \pm 0.009$	—	$0.38 \pm 0.007$

\* EC : esophageal carcinoma, CP : carcinomatous peritonitis, HCC : hepatocellular carcinoma, HC : hepatocirrhosis.

\*\* Mean values  $\pm$  S.D. of three determinations.

は銅並びに鉄ともキレートを生成することから、両成分を同時に定量する方法を検討し、コンパクトなダブルフローセルを製作して Fig. 7 に示す流路により、血清試料一回注入による二成分同時定量法を開発した。<sup>15)</sup> この方法により患者血清中の銅と鉄を定量した結果をTable 3 に示す。

試料2は銅の高値、鉄の低値がみられ悪性腫瘍の兆候を明確に示している。試料4, 5は肝疾患患者血清であるが、鉄の著しい高値あるいは低値の病的異常値を示していることが分かる。

ICP/AESはマルチ検出器としては優れているが、R.S.D.を比較するとFIAに比べ大きな値を示す。従って銅と鉄の同時定量に際しては装置の価格、小型化、操作の簡便性、要熟練などの点から、FIAの方が多くの利点を持っていると思われる。

---

本稿は1991年8月に開催された国際会議 Flow Analysis V期間中に急逝された九大名誉教授で本研究懇談会代表であられた故石橋信彦先生への追悼の意を表すものである。先生のご生前のご指導に感謝し深くご冥福をお祈り申し上げます。

#### 文献

- 1) S.Yamaguchi and K.Uesugi, Anal. Sci., 2, 149(1986).
- 2) H.X.Wen and D.P.Poe, Anal. Chim. Acta, 131, 195(1981).
- 3) T.Sakai, N.Ohno, S.Tsurubo, M.Tanaka and M.Horigome, Analyst[London], 109, 1043(1984).
- 4) S.Tsurubou and T.Sakai, Analyst[London], 109, 1397(1984).
- 5) 斎藤幹彦, 堀口大吉, 喜納兼勇, 分析化学, 30, 635(1981).
- 6) D.Horiguchi, M.Saito, K.Noda and K.Kina., Anal. Sci., 1, 461(1985).
- 7) D.Horiguchi, M.Saito, T.Imamura and K.Kina., Anal. Chim. Acta, 151, 457(1983).
- 8) H.Wada, T.Ishizuki and G.Nakagawa, Mikrochim. Acta, 1983III, 235.

- 9) N.Ohno and T.Sakai, *Analyst*[London], 112, 1127(1987).
- 10) T.Sakai and N.Ohno, *Anal. Chim. Acta*, 214, 271(1988).
- 11) T.Sakai, N.Ohno and K.Ida, *J. Liber. Art. Asahi Univ.*, 16, 87(1990).
- 12) S.Kawakubo, T.Katsumata, M.Iwatsuki, T.Fukasawa and T.Fukasawa, *Analyst*[London], 113, 1827(1988).
- 13) 藤原学, 松下隆之, 山庄司由子, 森田徹, 谷春仁, 田中稔, 庄野利之, *分析化学*, 40, 325(1991).
- 14) 周小靖, 石附朋典, 湯地昭夫, 山田碩道, 和田弘子, 中川元吉, 第14回 F I A 講演会講演要旨集, p 26(1990).
- 15) S.W.Kang, T.Sakai, N.Ohno and K.Ida, *Anal. Chim. Acta*, 261, 197(1992).
- 16) S.M.Ramasamy and H.A.Mottola, *Anal. Chim. Acta*, 127, 39(1981).

(1992年5月7日受理)