

《技 術》

ニッケル内標法を用いた生体試料中白金の原子吸光分析

木津 良一, 濱木 路子, 下沢 充子, 宮崎 元一

Atomic Absorption Spectrophotometric Determination of Platinum in Biological Materials Using Nickel as an Internal Standard

RYOICHI KIZU, MICHIKO HAMAKI, MITSUKO SHIMOZAWA
and MOTOICHI MIYAZAKI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University
13-1, Takaramachi, kanazawa 920 Japan

SUMMARY A method for the determination of platinum in biological materials by using nickel as an internal standard was established. Ten μg of nickel was added to samples which contained platinum. Nickel spiked sample was digested with nitric acid and hydrogen peroxide. Acid digest was evaporated to dryness and the residue was dissolved in 0.5ml of 1M nitric acid. The amount of platinum was measured by flameless atomic absorption spectrophotometer using background correction with deuterium lamp. Nickel was measured by flame atomic absorption spectrophotometer. The amount of platinum measured was corrected by the amount of nickel measured. Limit of detection of platinum in the proposed method was 0.05 ppm and the calibration curve showed good linearity in the range from 0.1 to 2.0 ppm.

The method is advantageous in reducing sample size and making highly sensitive analysis of platinum possible. Correction for the loss of platinum resulted from bumping or pretreatment of sample is also easy. The method will be helpful in determining platinum in pharmacological and pharmacokinetic studies of various antineoplastic platinum complexes.

結 言

近年、癌の化学療法に、白金錯体の制癌作用が注目されており、cis-dichlorodiammine Pt (II) (CDDP) は幅広い癌の治療に有効である

ことが認められ、臨床の場へも導入されている¹⁾。また CDDP に比べ更に制癌効果が高く副作用の少ない新しい白金錯体を追求した開発研究も進められている。しかしながら、CDDPを始め、これら白金錯体の作用機構や生体内代謝、組織分布などについての知見はまだ不十分であり、これに関連して白金錯体の生体内での挙動についての関心も高まっているが、それらの解明を志向した研究を進展させるために、現

金沢大学薬学部衛生化学教室
(〒920 金沢市宝町13-1)

受理日：昭和58年11月22日
受領日：昭和59年5月4日

ニッケル内標法を用いた生体試料中白金の原子吸光分析

在，生体試料中白金の簡便で高感度な分析法の確立が強く望まれている。

ところで，白金の分析法には，これまで種々の方法が報告されているが²⁾，原子吸光法による方法が，現在一般的で，生体試料中の白金の分析についてはフレイムレス原子吸光法による方法が若干報告されているに過ぎない³⁻⁶⁾。しかしこれらの方法は，一般に，多量の試料を必要とする，前処理が煩雑である，または濃縮ができないなどの点で，白金錯体の代謝研究を行なうためには不十分である。

今回著者等は，試料の酸分解の濃縮液について直接白金を測定できれば，用いる試料も少なく済み，前処理も簡便になると考え，内標法を組み合わせた生体試料中の白金のフレイムレス原子吸光分析を研究して，実用できる方法を確立したので報告する。

方 法

1. 試薬

白金及びニッケル標準溶液：市販の白金及びニッケルの原子吸光分析用標準液（1000 ppm，半井化学製）を，使用に際して1M 硝酸溶液で適宜希釈して使用した。

硝酸：有害金属測定用硝酸（和光純薬製）を使用。

蒸留水：水道水を蒸留後，更にイオン交換処理で精製して使用。

CDDP：名古屋市立大学薬学部分析化学教室から提供していただいた。

その他の試薬はすべて市販の特級試薬を用いた。

2. 生体試料及び動物

日本白色ウサギ（雄，体重約2.5 kg）を Oriental Yeast RC-4 及び水道水で約2週間飼育した後，エーテル麻酔下，頸動脈より脱血屠殺した。血液は1 mlにつき500単位のヘパリンを添加し，冷蔵保存した。各組織は屠殺後直ちに生理食塩水で灌流し分取した。各組織は-20°Cで冷凍保存し，用時に解凍使用した。

CDDP の投与は，CDDP を5%デキストロース溶液に溶解し，ウサギの体重1 kgあたりにつき3.8 mg の CDDP を，飼育したウサギの耳静脈内に注射した。

3. 装置

白金は，日立 308 型 2 波長原子吸光光度計に日立 GA-2 形グラファイトアトマイザーを接続し，フレイムレス原子吸光光度計として測定した。キュベット及びロッドは日立 GA-2形用

Table I Analytical conditions of Pt

Instrument	Hitachi atomic absorption spectrophotometer type 308 Hitachi graphite atomizer type GA-2 Hitachi recorder type 056
Wave length	Pt 265.9 nm D ₂ 263.6 nm
Lamp current	Pt 10 mA D ₂ 20mA
Slit	No. 2 (En.) -No. 2 (Ex.)
Sheath gas	argon, 3 l/min.
Drying	100°C (20A) -30 sec.
Ashing	1500°C (120A) -50 sec.
Atomizing	2800°C (300A) -8 sec.
Sample volume	20 μl
Cuvette type	carbon tube

Table II Analytical conditions of Ni

Instrument	Hitachi atomic absorption spectrophotometer type 170-10 Hitachi recorder type 056
Wave length	232.0 nm
Lamp current	15 mA
Combustive gas	air, 1.6 kg/cm ² (about 7.8 l/min.)
Fuel gas	acetylene, 0.3 kg/cm ² (about 2.0 l/min.)

を使用し、キュベットは50検体測定毎に、ロッドは100検体測定毎に交換した。ニッケルの測定は、日立170-10形原子吸光光度計を用いて行った。各測定条件を Table I, II に示した。

4. 操作

ケルダール分解フラスコ (30 ml) 内に試料の約 1 ml 又は 1 g を精密に秤取し、10 ppm ニッケル溶液 1 ml, 硝酸 5 ml 及びガラス製の沸騰棒 (約 1φ×1cm) を加え、分解用電気炉で 120°C 以下で加熱する。フラスコ内の試料が十分溶解した後、分解温度を 120°C 以上に上げ強熱する。フラスコ内の溶液が 0.5 ml 程度になったら加熱をやめ、放冷する。冷後、分解フラスコに硝酸 2 ml 及び30%過酸化水素水 0.5 ml を加え、内容量が 0.5 ml 程度になるまで強熱する。この操作を 5 回繰り返し、最終的に分解フラスコ内の液量を 0.5 ml 程度とする。この分解溶液を共栓の 10 ml 遠沈管に洗い込み、60°~70°C に加温しながら減圧留去する。残渣に 1M 硝酸 0.5 ml を加え溶解する。不溶解物は 3000 rpm で 5 分間遠心し除去し、上澄液をとる。上澄液の一部は蒸留水で10又は20倍に希釈し、ニッケルを定量する。残りの上澄液は白金を定量する。白金の定量では D₂ ランプを用いてバックグラウンド補正を行なった。また、白金及びニッケルの吸光度は記録計上で得られるピーク高さとして測定した。

結 果

まず、本法の前処理操作で得られる湿式分解液中の共存物質が白金及びニッケルの測定に及ぼす影響を検討した。フレイム型で測定したニッケルの場合は、分解濃縮液の4倍以上の希釈液では全く共存物質の影響は見られなかった。そこで、ニッケルの添加量は、ニッケルの吸光感度及び希釈率を考慮して 10 µg とした。また、フレイムレス型で測定した白金の場合は、原子吸光段階での灰化温度と灰化時間が白金の測定に大きく影響した。その結果を Fig. 1 及び Fig. 2 にそれぞれ示した。まず標準白金溶液について、灰化温度を 1170°C から 2170°C まで変化させたところ、灰化温度が 1720°C 以下ではピーク高さは一定であったが、1720°C 以上ではピ

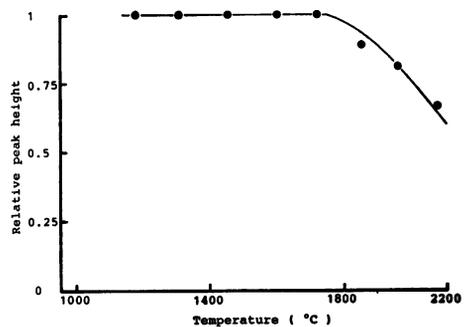


Fig. 1 Influence of ashing temperature on peak height of Pt in flameless atomic absorption spectrophotometry.

Pt ; 2 ppm in 2M HNO₃,
Ashing time ; 40 sec.

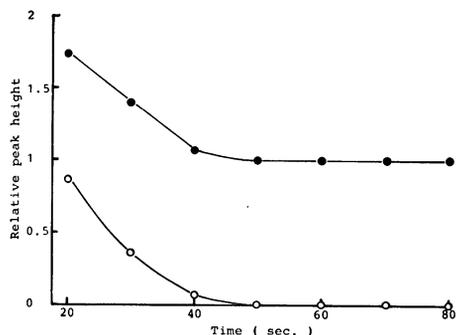


Fig. 2 Influence of ashing time on peak height of Pt in flameless atomic absorption spectrophotometry.
 ●—● ; Pt 2 ppm in acid digest of blood (rabbit)
 ○—○ ; Pt free acid digest of blood (rabbit)
 Ashing temperature ; 1500°C

ーク高さの減少がみられた (Fig. 1)。このことは、灰化温度が1720°C以上では灰化段階で炭素炉内から白金が揮散するためだと考えられる。そこで灰化温度は、1500°Cに設定した。次に白金 2 ppm を含むように調製したウサギ血液の湿式分解濃縮液と白金を含まない湿式分解濃縮液について、灰化時間を20秒から80秒まで変化させたところ、灰化時間が40秒以下では D_2 ランプによるバックグラウンド補正を行なっているにも拘らず大きなブランク吸収が見られた。しかし、灰化時間を50秒以上とすることによってブランク吸収のない精度の良い定量ができた。この他同様の検討をウサギの血漿、尿、胆汁、肝臓及び腎臓の湿式分解濃縮液について行なったところ、いずれの検体においても1500°Cで50秒の灰化で十分白金を測定することができた。

白金及びニッケルの吸光感度に及ぼす硝酸濃度の影響を検討した結果を Fig. 3 に示したが、ニッケルの場合は、硝酸濃度が 0~4M の範囲で吸光感度は全く影響を受けず、硝酸によるブランク吸収もみられなかった。白金の場合では、硝酸濃度が 0~0.5M の範囲でピーク高さが減少したが、硝酸濃度が 1M 以上では一定

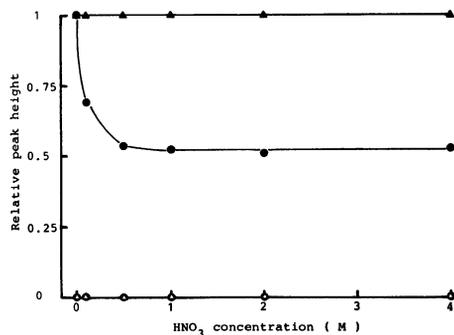


Fig. 3 Influence of HNO₃ concentration on peak heights of Pt and Ni.
 ●—● ; Pt 2 ppm, ○—○ ; Pt blank
 ▲—▲ ; Ni 1 ppm, △—△ ; Ni blank

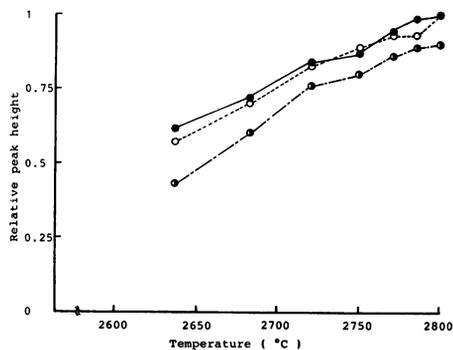


Fig. 4 Influence of atomizing temperature on peak height of Pt in flameless atomic absorption spectrophotometry at various atomizing time.
 Atomizing time ; ●—● : 8 sec,
 ○—○ : 6 sec (●—● : 4 sec)

となった。この現象は他の金属の場合と同様に、原子吸光での灰化段階で白金が蒸気圧の低い酸化物を形成して吸光感度が減少したことが一つの理由と考えられる。また、硝酸によるブランク吸収は 0~4M の範囲でみられなかった。そこで、湿式分解液の減圧留去で得られる残渣は 1M 硝酸で溶解することとした。

次に白金 2 ppm を含むように調製したウサギ血液の湿式分解濃縮液を用いて、原子化の条

Table III Determination of Pt in biological materials

Pt added ($\mu\text{g/ml}$ or $\mu\text{g/g}$)	Pt found ($\mu\text{g/ml}$ or $\mu\text{g/g}$)		C. V. (%)
	mean	S. D.	
0.2	0.19	0.02	10
0.5	0.48	0.05	10
1.0	0.96	0.07	7
2.0	2.00	0.04	2

n = 4

Sample ; blood, liver or kidney (rabbit)

件を温度及び時間について検討した。その結果を Fig. 4 に示す。原子化温度を高めるに従いピーク高さも増加し、本装置で設定可能な最高温度の時にピーク高さも最高となった。このことは、白金の蒸気圧が低いために2800°Cにおいても原子化効率が100%となっていないためと考えられる。また、原子化時間は6秒以下では、ピーク高さも低くなり再現性も悪くなった。そこで原子化の条件は、2800°C—8秒と定めた。

次にウサギ血液 1 ml に白金を 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 μg 添加して検量線を作成した。その結果を Fig. 5 に示す。白金濃度に対して、ニッケルと白金のピーク高さの比をプロットすると、図に示したように相関係数 0.998 の良い直線が得られた。また、このとき白金の検出限界は 0.05 ppm であった。そこで、ウサギの血液、肝臓及び腎臓の任意の試料に白金を添加し、定量精度を検討した。その結果を Table III に示す。一定の白金濃度について4個の検体を作成し、白金を定量したところ、検討した何れの濃度においても変動係数10%以内であり、生体試料中白金の分析法としては良好な結果が得られた。また、血液、肝臓及び腎臓の何れの生体試料を用いた場合でも、白金の定量結果に差は認められなかった。

次にウサギに CDDP (3.8 mg/kg weight) を静脈内に注射後、経時的に採血し本法を用いて血液中の白金濃度を定量した。結果を Fig. 6

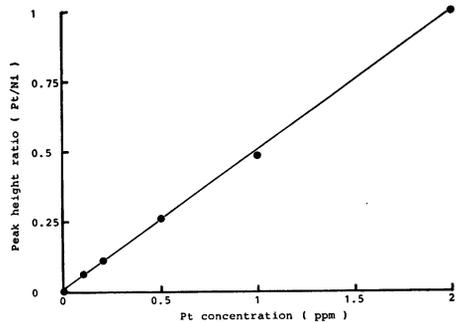


Fig. 5 Calibration curve for Pt by internal standard method.

Regression line ; $Y = 0.5X + 0.01$

Relative coefficient ; 0.998

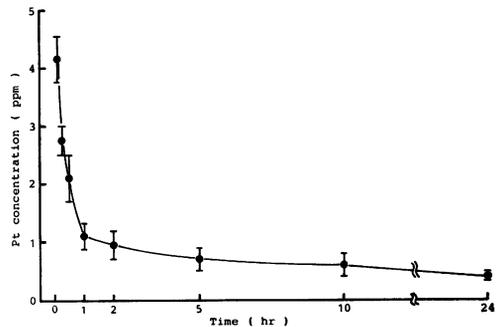


Fig. 6 Time course study on Pt concentration in blood after intravenous injection of cis-dichlorodiammine Pt (II) in rabbits.

Dose ; 2.5mg Pt/kg weight

All points and vertical bars indicate means \pm S. D. (n=4)

に示したが、血液中白金は投与後30分までは急速に減少したが、2時間後以降は非常に緩やかに減少し、CDDP 静注後の血液中白金は典型的な二相性を示した。半減期の $t_{(1/2)\alpha}$ は約20分、 $t_{(1/2)\beta}$ は約25時間であった。

考 察

生体試料中の重金属を原子吸光法で測定する際の前処理としては、硝酸、過塩素酸、硫酸等の混酸による湿式分解が最も良く用いられている。しかしながら、湿式分解を行なう場合には、最終的な分解液の全量を 0.5 ml, 1 ml に定容とすることは非常に困難であるので、5 ml 以上で定容とする場合がほとんどである。従って試料中の白金濃度が低い場合は大量の試料を必要とするが⁴⁾、これは白金錯体の代謝研究を行なう上で不利である。

また、生体試料の湿式分解では、分解中の金属の揮散は少ないが、分解中に試料の突沸による物理的な損失がしばしばみられる。試料の突沸を防ぐためには、煩雑な前処理が必要となる⁵⁾。

そこで著者等は、湿式分解液を 0.5 ml 程度まで濃縮し、また突沸等による物理的な容量変化を補正するには、湿式分解中の揮散及び外部からの混入の少ない金属を一定量添加して、この金属の検出量で検出白金量を補正することが有効であると考え、生体試料中白金のフレームレス原子吸光分析にニッケルを用いる内標法を考案し、適用した。内部標準金属としては、

1) 生体内に存在しないか、存在しても極微量である 2) 湿式分解中の揮散及び外部からの混入が少ない 3) 原子吸光法で容易に定量できることなどが必要である。今回、著者等は上記の条件を満たす重金属として、白金と同族元素でもあるニッケルが適していると考え、これを用いたところ良好な結果を得ることができた。

内標法では、白金と内部標準金属であるニッケルの同時分析が望ましく、著者等もフレームレス原子吸光法で二波長による同時定量を試みたが、白金はバックグラウンド吸収が大きく、十分な結果は得られなかった。そこで白金は D_2 ランプによるバックグラウンド補正を行な

って定量し、吸光感度の高いニッケルは分析時間の短縮を考慮しフレーム型の原子吸光法で定量することとした。

生体試料の湿式分解法では、Jones³⁾は最も一般的な硝酸一過塩素酸の混酸を用いているが、精度良く白金を測定するには原子吸光での灰化段階で 1900°C で過塩素酸を揮散させることが必要だとしている。しかし、Smeyers-Verbeke等⁶⁾及び著者等の実験では、1700°C以上の灰化温度では吸光度の減少がみられている。また、Pera等⁴⁾は硝酸のみによる湿式分解を行なっているが、試料の分解には24時間の還流を行っており、実際的でない。生体試料の湿式分解において、硝酸のみでは分解力が弱いと考えられるので、著者等は硝酸一過酸化水素水系による湿式分解を行なったところ、操作の項で述べたような簡便な前処理と原子吸光段階での1500°C—50秒の灰化との組み合わせにより、Fig. 5及び Table III に示したように生体試料中の白金を十分定量することができた。

以上述べたように、本法は試料の微量化や白金の高感度分析に好都合であるとともに、前処理も簡便であり、また突沸等による試料の物理的な損失も補正できる。本法は生体試料中白金の分析法として十分使用できると考えられる。

謝辞 試料の白金錯体を御供与下さった名古屋市立大学薬学部、喜谷喜徳教授に深謝致します。

文 献

- 1) A. W. Prestayko, S. T. Cooke and S. K. Carter : *Cisplatin; Current Status and New Developments*, Academic Press, New York (1980)
- 2) National Research Council 編, 和田 攻, 松井寿夫, 小野哲, 山本昭子訳: 環境汚染物質の生体への影響 11; 白金族元素, 東京化学同人, 東京 (1980)
- 3) A. H. Jones : *Anal. Chem.*, **48**, 1472 (1976)
- 4) M. F. Pera, Jr. and H. C. Harder : *Clin. Chem.*, **27**, 1245 (1977)
- 5) A. F. Le Roy, M. L. Wahling, J. H. Sponseller, W. S. Friauf, R. E. Solomon and P. L. Dedelek : *Biochem. Med.*, **18**, 184 (1977)
- 6) J. Smeyers-Verbeke, M. R. Detaevernier, L. Denis and D. L. Massart : *Clin. Chim. Acta*, **113**, 329 (1981)