

電気透析による生体試料中金属の抽出法に関する研究

今成登志男[®]， 大久保 登 ， 早川 和一 ， 宮崎 元一*

(1978 年 11 月 7 日受理)

生体試料中の金属を電気透析試料調製器によって陽イオンとして直接抽出する方法(A法)と EDTA-金属錯体として陰イオンとして抽出する方法 (B法)について条件の検討を行った。

A法の条件は泳動液 0.05N 酢酸，電流密度 15 mA/cm²，抽出時間 (20~40) 分，B法の条件は泳動液 0.05N 水酸化アンモニウム-1 mM EDTA，電流密度 20 mA/cm²，抽出時間 (20~40) 分であった。A法では鉄(III)，銅(II)の回収率 80%，亜鉛(II)の回収率は 90%，一方B法については鉄(III)，亜鉛(II)の回収率 100%，銅(II)の回収率は 95%であった。たん白質として牛血清アルブミン，電解質として塩化ナトリウムの共存の影響を調べた後，B法を血しょう中のアルブミン結合亜鉛の分析に応用した。

1 緒 言

金属の測定機器は近年，精度及び感度においても著しい発展を遂げているが，自然界に存在する金属の分析に広く応用するためには試料の前処理が重要である。

著者らは原子吸光法を用いて生体内金属を存在様態に基づいて分画分析する研究の一環として金属を電気透析によって分離・抽出する前処理法を検討した。電気透析器には著者らの開発した電気透析試料調製器[®]を使用し，生体内金属に応用するための基礎的条件を調べるとともに，血しょう中亜鉛の分画分析への応用を試みた。

2 試薬及び装置

2.1 試 薬

試薬類はすべて市販特級品を使用し，金属については硝酸塩を用いた。陰イオン交換膜は旭化成工業製 Aciplex[®] A-201，陽イオン交換膜は同社製 Aciplex[®] K-101 の供与を受けた。セルロース膜は Visking Co. 製の C-65 を使用した。

2.2 装 置

2.2.1 電気透析器 先に報告した電気透析試料調製器[®]を使用した(Fig. 1)。陽極室，陰極室には各々 20 ml，抽出室には 2 ml の泳動液を入れる。試料室には 2 ml の試料を入れて泳動を開始する。泳動条件は各図表に示した。隔壁の面積は 2 cm² である。電極には白金板を用いた。安定電源装置にはミツミ SJ-1061 型を使用した。

* 金沢大学薬学部：石川県金沢市宝町 13-1

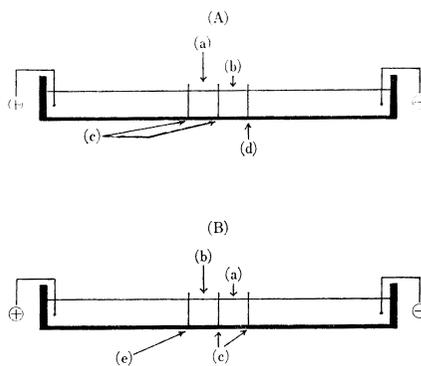


Fig. 1 Electro-dialytic sample preparator

(A) Apparatus A (for low molecular cationic ions), (a) sample chamber, (b) extract chamber, (c) cellulose membrane (Visking, C-65), (d) anion exchange membrane (Aciplex A-201), carrier solution: 0.05 N CH₃COOH; (B) Apparatus B (for low molecular anionic ions), (a) sample chamber, (b) extract chamber, (c) cellulose membrane (Visking, C-65), (e) cation exchange membrane (Aciplex K-101); Carrier solution: 0.05 N NH₄OH-1 mM EDTA

2.2.2 原子吸光分析装置 日立製作所製 308 形二波長原子吸光分光光度計を使用した。

3 実験及び実験結果

3.1 電気透析の条件

金属イオンを酢酸の泳動液で陰極側に抽出する場合

(A法)とEDTAと錯体を生成させてアンモニアを泳動液として陽極側に抽出する場合(B法)の二つの方法について泳動条件を検討した。

3.1.1 A法(金属イオンとしての抽出) 装置Aを使用し、金属イオンとしては鉄(III)、銅(II)、亜鉛(II)を用いて泳動条件を検討した。泳動液にはTsunakawa²⁾が電気抽出で用いた0.05N酢酸を適用し、抽出時間を20分に設定して、電流密度を変化させながら抽出室への金属の移行を原子吸光法で測定した(Fig. 2)。回収率は抽出室に捕集された金属イオン量を試料中金属イオンに対する割合(%)で表したものである。電流密度5 mA/cm²以上で銅(II)は約80%、鉄(III)、亜鉛(II)は90%の回収率で一定になった。酢酸濃度を0.1N、0.5Nにしても回収率に大きな変化が見られなかった。

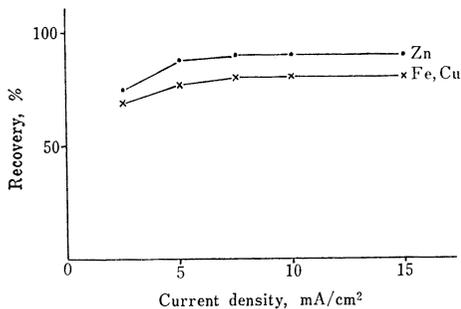


Fig. 2 Effect of current density on the extraction of metals by Mode A

Condition—Carrier soln.: 0.05 N CH₃COOH, extraction time: 20 min; Sample: A mixture of Cu(II) (0.5 µg/ml), Zn(II) (0.5 µg/ml) and Fe(III) (1.0 µg/ml)

3.1.2 B法(金属-EDTAの抽出) 装置Bを用いて鉄(III)、銅(II)、亜鉛(II)をEDTA錯体として抽出することを試みた。泳動液として0.05N水酸化アンモニウム-1mM EDTAを用いて抽出条件を検討した(Fig. 3)。電流密度10 mA/cm²以上で銅(II)は95%、鉄(III)、亜鉛(II)はほぼ100%の回収率が得られた。B法においても水酸化アンモニウムの濃度を0.1N、0.5Nに代えても回収率への影響は見られなかった。

3.2 共存物質の影響

生体試料中には通常、たん白質や電解質が多く含まれるので本法を適用するに際してこれらの共存物質の妨害が考えられる。共存物質として塩化ナトリウム及び牛血清アルブミン(BSA)を用いて金属の回収率に及ぼす影

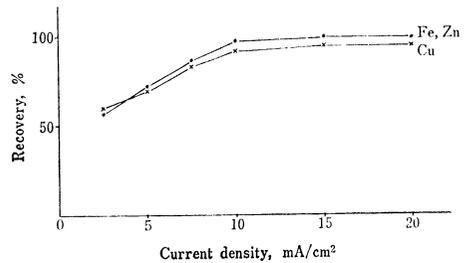


Fig. 3 Effect of current density on the extraction of metals by Mode B

Condition—Carrier soln.: 0.05 N NH₄OH-1 mM EDTA, extraction time: 20 min; Sample: A mixture of Cu(II) (0.5 µg/ml), Zn(II) (0.5 µg/ml) and Fe(III) (1.0 µg/ml)

響を調べた。銅(II)、亜鉛(II)の抽出に及ぼす塩化ナトリウム共存の影響をA法、B法について調べた結果をTable 1に示した。A法では0.05M塩化ナトリウムまで、B法では0.1Mまでの塩化ナトリウムの共存で回収率に大きな影響を与えないことを示している。

Table 1 Effect of NaCl concentration on the extraction of metals

| NaCl concentration | Recovery (%) | | | |
|--------------------|--------------|----|----------|-----|
| | Mode A† | | Mode B†† | |
| | Cu | Zn | Cu | Zn |
| 0 M | 80 | 90 | 95 | 100 |
| 0.05 " | 79 | 90 | 95 | 100 |
| 0.10 " | 58 | 69 | 90 | 95 |
| 0.15 " | 47 | 57 | 80 | 85 |

† Condition—carrier soln.: 0.05 N CH₃COOH, current density: 15 mA/cm², extraction time: 30 min; †† Condition—carrier soln.: 0.05 N NH₄OH-1 mM EDTA, current density: 20 mA/cm², extraction time: 30 min; Sample: A mixture of Cu(II) (0.5 µg/ml) and Zn(II) (0.5 µg/ml)

次にたん白質の影響を調べるためにBSAを共存させて銅(II)、亜鉛(II)の回収率を検討した(Table 2)。

B法ではBSAが3%共存していても銅(II)、亜鉛(II)の回収率に影響が見られない。A法においてはBSAの共存で銅(II)の回収率は著しく抑えられたが、亜鉛(II)についてはBSAが2%共存しても影響は比較的少なかった。

3.3 ヒト血しょう中亜鉛の分画分析への応用

ヒト血しょう中の亜鉛は主にα₂-マクログロブリン(α₂-M)とアルブミン(Alb)に結合して存在するが、各々に含まれる亜鉛を分画して定量することが臨床的に

Table 2 Effect of bovine serum albumin (BSA) concentration on the extraction of metals

| BSA concentration | Recovery (%) | | | |
|-------------------|--------------|----|----------|-----|
| | Mode A† | | Mode B†† | |
| | Cu | Zn | Cu | Zn |
| 0% | 80 | 90 | 95 | 100 |
| 1" | 10 | 88 | 95 | 100 |
| 2" | 8 | 85 | 95 | 100 |
| 3" | 5 | 75 | 95 | 100 |

† Condition: carrier soln.—0.05 N CH₃COOH, current density: 15 mA/cm², extraction time: 30 min; †† Condition—carrier soln.: 0.05 N NH₄OH-1 mM EDTA, current density: 20 mA/cm², extraction time: 30 min; Sample: A mixture of Cu(II) (0.5 μg/ml) and Zn(II) (0.5 μg/ml)

も重要視されている。

Giroux ら³⁾ が最近開発したポリエチレングリコール (PEG) で α₂-M と Alb を分画後, 原子吸光法 (AAS) で亜鉛を定量する方法は簡便であるが, Alb 分画中の亜鉛を定量する際に PEG を含んだまま AAS で分析しており, 試料の粘度が高いため測定値にばらつきが見られ正確な定量は困難である。

著者らはここに上記の電気透析法 (B 法) を応用し, 次のような Alb 結合亜鉛の定量法を確立した。簡便法として血しょう中の総亜鉛を直接希釈法によって AAS で測定すれば α₂-M 結合亜鉛も計算で求められる。

3.3.1 ヒト・アルブミン 結合亜鉛の定量 ヒト血しょう 1 ml に 20% PEG (0.05 M トリス塩酸緩衝液 -0.02% アジ化ナトリウム中, pH 7.1) 1 ml を加え, 3°C で 10 分間放置後, 遠心分離する。上清 1 ml を採り, 0.05 N 水酸化アンモニウム-1 mM EDTA 1 ml を加え試料とし, 装置 B を用いて泳動条件: 0.05 N 水酸化アンモニウム-1 mM EDTA, 20 mA/cm², 40 分間で電気透析し, 抽出液中の亜鉛を AAS で測定する。電気透析の回収率は 90% であり, 測定値を補正する。

3.3.2 血しょう中総亜鉛の定量 血しょうを 0.05 N 水酸化アンモニウム-1 mM EDTA で 5 倍希釈し, 直接 AAS で亜鉛を分析する。

α₂-M 結合亜鉛はここに得られた 総亜鉛と 3.3.1 で得られた Alb 結合亜鉛の差で求められる。

3.3.3 ヒト血しょう中亜鉛の測定結果 ヒト血しょう, 3 例への応用の結果を次に示す。

Table 3 Determination of zinc in human plasma (μg/ml)

| Sample† | 1 | 2 | 3 |
|--|------|------|------|
| ① Total Zn | 0.63 | 0.68 | 0.51 |
| ② Albumin-Zn†† | 0.36 | 0.41 | 0.27 |
| ①-② (α ₂ -Macroglobulin-Zn) | 0.27 | 0.27 | 0.24 |

† Plasma was obtained from heparinized blood of a healthy man. †† The method described in the text (3.3.1) was used.

4 考 察

本実験で電気透析器に用いられる各種の膜は金属イオンを吸着しないことが必要条件である。そこで膜の金属吸着性を検定する方法を設定して膜の選択に利用した。

Table 4 は鉄(III), 銅(II), 亜鉛(II) について A 法及び B 法の泳動液中における膜の金属吸着を調べた結果である。Table 4 の下欄に示す条件下での 3% 以下の吸着は 0% として表示した。A 法では半透膜としてセルロース膜を使用しているが, 銅(II) がやや吸着しやすい。Fig. 2, 3 で銅の回収率が亜鉛に比してやや低いのはこの吸着も原因と考えられる。アセチルセルロースやニトロセルロース膜は銅(II) の吸着が少ないが, 物理的強度が十分でなく使用できなかった。又, A 法で使用している陰イオン交換膜 (Aciplex® A-201) には鉄(III), 銅(II), 亜鉛(II) の吸着は全く見られなかった。B 法において金属は EDTA 錯体として存在し, 装置 B

Table 4 Adsorption of metals on membranes (%)

| Membrane | Mode A (0.05 N CH ₃ COOH) | | | Mode B (0.05 N NH ₄ OH-1 mM EDTA) | | |
|---|--------------------------------------|----|----|--|----|----|
| | Fe | Cu | Zn | Fe | Cu | Zn |
| Cellulose membrane (Visking, 8/32) | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cellulose membrane (Visking, 30/32) | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cellulose membrane (Visking, C-65) | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Triacetyl cellulose membrane (Fuji, FM-120) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Nitrocellulose membrane | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Polyethylene membrane | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Anion exchange membrane (Aciplex A-201) | 0 | 0 | 0 | 65 | 60 | 70 |
| Cation exchange membrane (Aciplex K-101) | 70 | 70 | 75 | 0 | 0 | 0 |

Experiment: A test membrane (1×4 cm) was immersed in 3 ml of carrier solution containing Fe(III) (1.0 μg/ml), Cu(II) (0.5 μg/ml) and Zn (II) (0.5 μg/ml), and kept for 1 h with occasional shaking. The concentration of metals in the solution was measured by AAS and compared with that of the original solution.

に使用しているセルロース膜や陽イオン交換膜 (Aciplex® K-101) への吸着は見られない。

電気透析の条件はA法では 0.05 N 酢酸, 15 mA/cm² (20~40) 分間, B法では 0.05 N 水酸化アンモニウム-1 mM EDTA, 20 mA/cm², (20~40) 分間が共存物質の少ない場合普遍的な条件として用いられる。電流をこれ以上流すと電圧は 170V を越え泳動液が発熱する。電解質やたん白質が共存する場合は 3.2 の実験結果が示すように応用する試料と目的を考慮して条件を設定する必要がある。B法はアンモニア・アルカリ性で電気透析するためにたん白質を多く含む試料に適用しても通常, たん白質は溶解していて析出しない。このような理由から 3.3.1 の PEG 処理上清への応用はB法を適用して抽出時間を検討した (Fig. 4)。

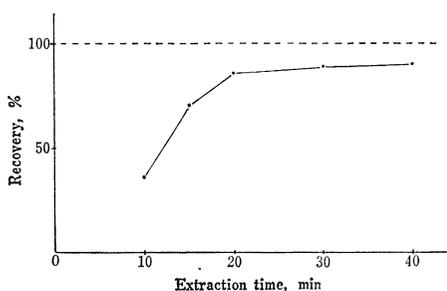


Fig. 4 Electrodiolytic extraction of zinc in the supernatant separated by PEG treatment from human plasma

Condition—Carrier soln. : 0.05 N NH₄OH-1 mM EDTA, current density : 20 mA/cm²; Sample—The supernatant (see in the text) 1 ml+carrier soln. 1 ml

塩化ナトリウム及びアルブミンの影響を考慮して最終的に4倍希釈後, Fig. 4 に示す条件で経時的に亜鉛の回収率を測定すると抽出時間 (30~40) 分で回収率は湿式灰化して得られた値の 90% で一定となった。測定値をこの回収率で補正すると Alb 結合亜鉛を正確に定量できる。Giroux らの報告³⁾にもあるが, Table 3 のとおりヒトの血しょう中の α₂-M に結合した亜鉛は比較的一定であり, Alb 結合亜鉛が生理的に変動しやすいことがうかがわれる。この結果からも Alb 結合亜鉛の定量法が臨床的に広く応用されると思われる。

5 結 語

イオン交換膜を使用した新しいタイプの電気透析器を用いて, 生体試料中の金属をイオンのまま, 又は EDTA 錯体として分離, 抽出する条件を検討した。

本法は試料のクリーン・アップばかりでなく, 試料室

と抽出室の容量比を大きく変えたり, 試料をポンプで送ることによって濃縮にも使用できる利点があり, 今後の発展が期待される。

終わりに, イオン交換膜を御供与くださった旭化成工業(株)並びに装置の一部を御貸与くださった第一製薬(株)に深謝します。

(1978年10月, 日本分析化学会)
(第27年会において一部発表)

文 献

- 1) 今成登志男, 宮崎元一: 分化, **28**, 65 (1979).
- 2) N. Tsunakawa: *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 1164, 2579, 2585 (1971).
- 3) E. L. Giroux: *Biochem. Med.*, **12**, 258 (1975).

☆

Studies on the electrodiolytic extraction of metals from biological materials. Toshio IMANARI, Noboru OKUBO, Kazuichi HAYAKAWA and Motoichi MIYAZAKI (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, 13-1, Takara-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa)

The extraction of metals from biological materials by an electrodiolytic sample preparator was studied. Two procedures are proposed in this method: one depends on the extraction of metals as cationic ions (Mode A) and the other depends on the extraction of metal-EDTA complexes as anionic ions (Mode B). The basic conditions for Mode A are: carrier solution; 0.05 N CH₃COOH, current density; 15 mA/cm², extraction time; (20~40)min. The conditions for Mode B are: carrier solution; 0.05 N NH₄OH-1 mM EDTA, current density; 20 mA/cm² and extraction time; (20~40)min. The recoveries of Fe(III), Cu(II) and Zn(II) in Mode A were 90, 80 and 90%, and in Mode B the recoveries were 100, 95 and 100% respectively. The effects of electrolytes and proteins on the extraction of metals were examined, and the application of Mode B for the determination of albumin bound zinc in human plasma was carried out as follows: the supernatant containing albumin bound zinc was obtained by polyethylene glycol treatment³⁾ and subjected to electrodiolysis for 40 min according to the conditions described in Mode B. Albumin bound zinc in the extract was determined by atomic absorption spectrometry (AAS). Total plasma zinc was measured according to direct dilution method by AAS and α₂-macroglobulin bound zinc was obtained by the difference.

(Received Nov. 7, 1978)

Keywords

Albumin bound zinc
Biological materials
Electrodiolysis
Metal ions
Sample preparator