

〈総説〉

酸素噴射式燃焼法を用いる生体試料中のリン、硫黄、ハロゲンのトレースアナリシス

馬場 芳子

The flushed oxygen combustion method with the biological material for trace analysis of phosphorus, sulfur, and halogen

Yoshiko Baba

Summary Phosphorus, halogen and sulfur in samples of the organ were measured using the flushed oxygen combustion method. Phosphorus in the sample of an organ remained in the combustion tube, and revealed its structural characteristics. Organic chlorine was separated from the inorganic chlorine and phosphorous. Organic sulfur and fluorine were separated from the phosphorous and then measured.

Key words: Bowel, Phosphor, Sulfur, Halogen, Flushed oxygen combustion method

I. はじめに

未知の試料の成分組成の推定には化学的手法が用いられる¹⁾。なかでも18世紀にLavoisierに始まった有機元素分析はPregl²⁾が微量分析法を開発して以来、有機試料の元素分析の手段として用いられてきた。

有機試料の測定に、無機体に変換した後のガスを“熱伝導度測定”を始めとする物理的方法で測定する装置が出現³⁾してからはコンピューターの進歩とともに広範な普及をしている。しかし、装置が高度に自動化して進歩する一方、ブラックボックス化についての問題点も指摘されている⁴⁾。阪本らは有機試料の酸化分解法として試料気化ガスに熱酸素を吹き付ける酸化分解方式の優れた分解効率⁵⁾に着目して、各種の酸素を吹き付ける燃焼分解方式について比較を行い、

有機試料中に微量に含まれる硫黄、ハロゲンを短時間に効率よく酸化分解して測定する方法を検討した⁶⁾。

本法は生体成分の迅速分析への応用が試みられ、ラットレバーを短時間に燃焼分解し³Hや¹⁴Cを³H₂Oや¹⁴CO₂としてシンチレーション計数装置で回収して満足すべき結果を得ている⁷⁾。

生体試料の組成を調べる場合、炭素、酸素、水素は生体高分子の場合、主要元素として無数の組み合わせであることから組成についての予測が難しく、むしろ窒素、リン、硫黄が特徴的であるとされる⁸⁾。著者は、本法の生体試料中の硫黄、ハロゲン、リンへの応用を検討して得た知見を報告し、合わせて酸素噴射式燃焼方式を用いる有機元素分析法の生体試料への分析方式について論じる。

〒353-0004 埼玉県志木市本町2-5-26

受領日 平成24年6月22日

受理日 平成24年8月26日

(former)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo.

II. 酸素噴射式燃焼法

有機試料を燃焼管内で燃焼分解し無機体に変換して元素組成を測定する方法はLiebig、Pregl、Dumas^{2,9)}以来活用されてきている。有機試料を効率よく燃焼分解して無機体に変換する目的で、燃焼管内には酸化触媒を充填して用いる。Pfabは酸化触媒によらないで、燃焼管の中間から酸素を供与する燃焼方式による優れた酸化分解効率を利用して、各種の有機試料を無機体に変換して、多数試料の測定結果が得られる方法を発表している⁵⁾。これに対してKainzら¹⁰⁾は2重の燃焼管を作り、加熱分解した試料気化ガスを内側の管から外側の管内に流れている酸素気流中に吹き出させる燃焼方式を用いて、各種の元素を測定する方法を発表している。阪本⁶⁾らは燃焼管内に酸素を吹き出させる燃焼方式の比較検討を行った。また、得られた結果に基づき有機試料中に少量または微量に含まれる硫黄、ハロゲンの測定を行った。現在、市場に普及している炭素、水素、窒素三元素同時測定装置は、有機試料を燃焼分解して無機体に変換して、二酸化炭素、水、窒素として測定する際の検出系や、窒素酸化物を窒素に還元するために用いる還元銅を消耗するため、酸素の使用が制限される。また、硫黄、ハロゲンの分析には酸素フラスコ燃焼法¹¹⁾用いられることが多いが、これに対して燃焼管を用いる方法はサンプリングポートに量り取った試料をそのまま燃焼管内で測定でき

る簡便さがある。さらに、有機試料を燃焼分解後のサンプリングポート内から試料中の無機物の情報を得られる上に、連続分析を可能にする利点がある。著者は、難燃性の有機試料の燃焼分解に優れた酸化分解効率を示す本法を生体試料、特に、薬物代謝を行う主要な臓器の一つである肝臓中のハロゲン、硫黄、リンの測定を目的として応用を検討した。本法は酸化分解効率のすぐれた燃焼分解方式を用いて、試料の完全酸化を計ることを目的にしている。そのために試料に直接酸素を吹き付ける装置を組み立てるにあたって、不完全燃焼に起因する誤差原因を簡易に突き止めることができる方法を選択した。

III. 酸素噴射式燃焼法による臓器燃焼におけるノズル間距離と試料焼却炉昇温方式の検討

1. 装置および器具

- 燃焼管の選定 通常のマイクロ法の1.2 cm直径の石英製燃焼管では0.5 g以上の生試料を入れて燃焼するには操作が煩わしく、また、不完全燃焼を生じ燃焼管末尾、あるいは燃焼管入り口付近や燃焼分解したガスの吸収管を汚染した。予備実験の結果、本実験では外径2.3 cmの石英燃焼管(図1)を用いて臓器試料を対象とし、本法による燃焼分解法を検討した。燃焼管末は擦り合わせとし、酸化分解ガスの吸収用蛇管を連結できるようにした。
- 酸素ガス噴き出し管として径0.4 cmの石英管

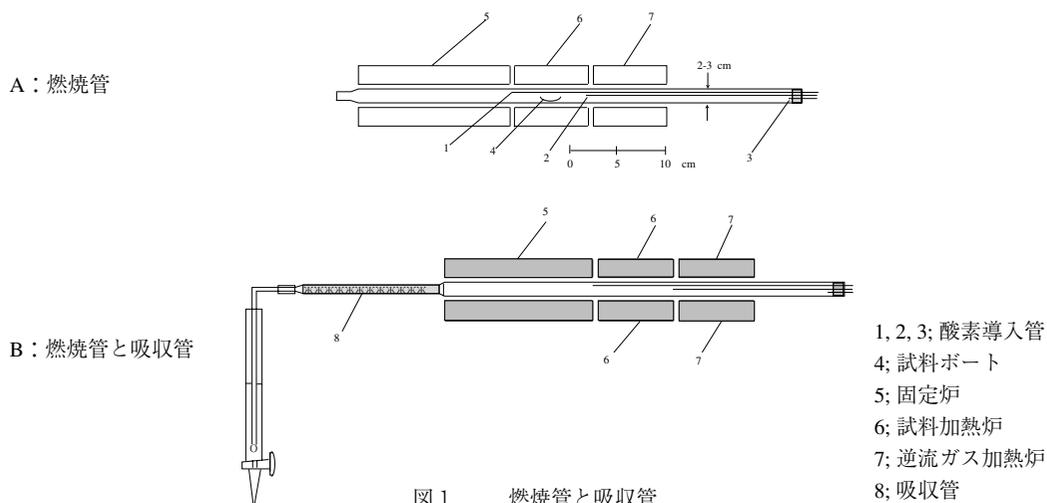


図1 燃焼管と吸収管

を3本用い、1本は燃焼管の入り口から、他の2本は図1のように燃焼管の中間から（試料ポートを挟んで前後から）酸素を吹き付けるのに用いた。

3) 流量計及びニードルバルブ

ガスボンベに連結してガス流量をコントロールする。

4) 計泡器¹³⁾ 管内ガス圧の微妙な変動を捕らえることができるので特に脂肪分の多い試料の爆発燃焼を未然に察知できて便利

5) サンプリングポート¹³⁾

試料を量り取る磁製のポート。

6) 酸化分解したガスの吸収用に用いる蛇管^{14) 2)} 燃焼管出口との連結部をすりあわせとしたもの（図1）

7) 化学はかり

島津ML200及びメトラM3を使用した。

8) 分光光度計は日立557を用いた。

2. ノズルの位置

ノズルの位置の基礎的検討を行う必要上、毎回位置をずらすだけで実験を行えるよう燃焼管入り口のゴム栓に穴をあけて細い石英管を2本燃焼管管内に入れ酸素吹出し口とした。別に燃焼管入り口から計泡器および流量計を通してガスを導入した。ゴム栓を通してノズルの位置を自由に動かせる様にして検討を行った。ポート内に量り入れた試料はノズルから酸素を送りながら加熱分解した。ノズルの位置と試料の位置と

は相関し、ノズルの位置がより燃焼管末端に偏ると逆流（管内ガスが燃焼管出口と逆方向に流れる）が著しくなり、燃焼管内の試料気化ガスが滞留する。ノズルの位置が燃焼管入り口側に偏ると試料気化ガスは酸素と十分混和しないまま燃焼管を通過して不完全酸化を生じる。また、ノズルから酸素を送らないで多数の有機試料を短時間に燃焼すると不完全酸化を生じ、煤、あるいは酸化中間体を生じる。予備実験で試料の炭化分が燃焼管内に固着する場合があった。これは管壁の温度が低い場合に生じ、炉温を上昇させるか加熱時間を延長することで完全酸化に導くことができた。この知見に基づき図1に示すようにノズル部から吸収部に至る空間は長さ18 cmの固定炉で850℃に加熱した。また、燃焼管入り口方向に流れるガス（逆流するガス）の熱分解用に長さ10 cmの電気炉を置き、固定炉と逆流ガス分解用加熱炉の中間に試料分解用加熱炉を置いた。各加熱炉はスライダックで電圧調整した。導入ガスの回路は図2に示す。導入ガスの回路は図2に示す。酸素ボンベから送られたガスは、電磁バルブVEを経て燃焼管内へ送られる。燃焼管内へ送るガスは燃焼管の中間（試料ポートの前後）へ送るガスと、燃焼管入り口から送るガスとに2分される。燃焼管入り口から送るガスは、ニードルバルブ、流量計、計泡器を通して燃焼管入り口から送られる。計泡器は管内圧を微妙に反映するので計泡器の位置は重要である（図2のNo. 3に示す）。燃焼管

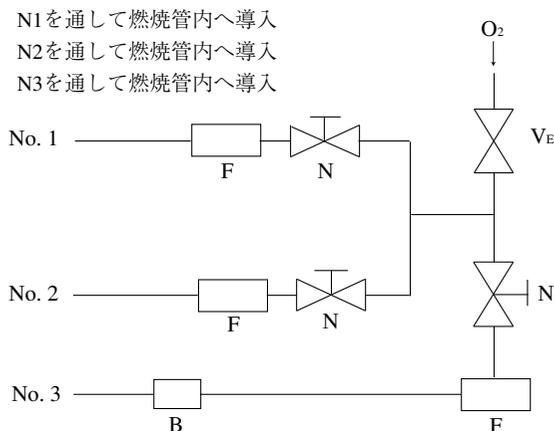


図2 酸素供給回路。 V_E: 電磁バルブ、N: ニードルバルブ、F: 流量計、B: 計泡器

の中間（試料ポート前後）から吹出させるガスは、電磁バルブVEを経て燃焼管内に導入されるが、2分され、それぞれにニードルバルブおよび流量計を経て試料ポートの前後に導入される。図2のNo. 1およびNo. 2に示す。

3. 試料加熱炉の昇温

試料加熱炉の昇温速度について種々検討の結果、次の知見を得た。急激な加熱による爆発は、400℃までの間に起きた。従って試料への加熱は400℃までは徐々に行った。400℃に到達したら（20-50 min）酸素は燃焼管入り口（図1の酸素導入管3）のみから10-20 ml/min送り、850-900℃までの昇温を速やかに行った（5 min）。短時間に完全酸化に導くため、燃焼管内ではノズルから酸素を吹出させる。このとき、燃焼管内ガス温度は、固定炉の昇温に伴って上がるので、脂肪分の多い試料の場合は、急な試料の加熱により爆発性燃焼が起こらないよう（脳、肝臓、腎臓などは注意が必要である）注意する。この場合、固定式燃焼法によらず、試料加熱炉は固定炉（Ef1）から離して試料に急に熱が加わらないように注意した。次にEf2およびEf3を固定炉の方に徐々に近づけ昇温した。検討の結果、酸素吹出し口（ノズル）を図1の位置にしたと

きに再現性よく完全燃焼の目的を達した。このとき酸素流量は燃焼管末端側のノズル（1）からは60-80 ml/min、燃焼管入り口側のノズル（2）からは5-20 ml/min、燃焼管の入り口ノズル（3）からは15-20 ml/minである。図2の計泡器は管内圧を微妙に示唆するので酸素流量がコントロールできる。

臓器試料燃焼分解のmanualの流れを図3に示す。

臓器試料には脂肪分に富んだ試料も多いので、画一的に行うことに問題は残るが、以下の臓器中のハロゲン、硫黄、リン測定のための試料焼却炉の昇温図の代表的例を図4に示す。

IV. 酸化分解試料の回収と測定結果

1. リン

燃焼管内および試料サンプリングポートと酸化分解ガスの吸収部を洗い出して、バナドモリブデン法でリンを測定した。

1) 操作

石英毛を束ねて長さ約0.7 cmに調製して燃焼管末端に充填した。吸着管（図1Bの8）内の蛇管は燃焼管からの着脱が容易にできるよう燃焼管末尾と摺り合わせにより連結する。蛇管部の末尾はガラス接続管を通してボールフィルターに連結する。ボールフィルターの先端は試験管内の吸収液中に浸される。蛇管末尾とボール

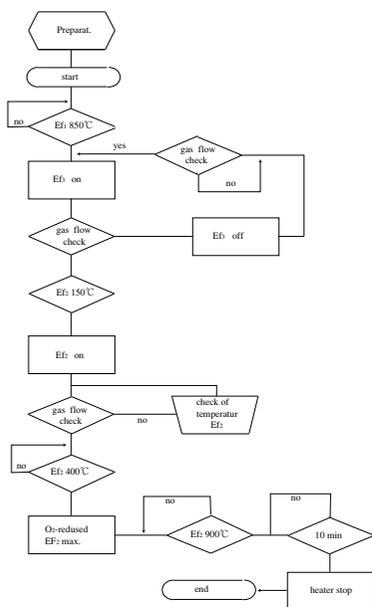


図3 試料焼却操作手順

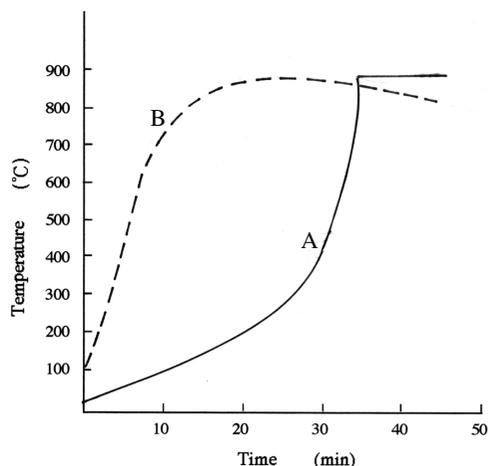


図4 試料焼却炉温度および固定炉温の経時変化
A：試料加熱炉、B：固定炉

フィルターの連結にはビニール管あるいはシリコン管を用いた。蛇管の擦り合わせ部を燃焼管末尾の擦り合わせ部に連結し、試料をサンプリング用のボートに量り取り、燃焼管内の定位置に入れ、酸素流量をニードルバルブと流量計で調製した。酸素を燃焼管内に送りながら試料を徐々に加熱分解した。加熱分解後、酸素を止め、燃焼管入り口のゴム栓を外し、燃焼管内のボートを取り出した。燃焼管および蛇管を取り外し、燃焼管、石英毛および吸収部（蛇管およびボールフィルターを含む）は、それぞれ、30%硝酸2 mlおよび熱蒸留水で蒸発皿に洗い出した後、硝酸カリウム0.2 gを加え水浴上蒸発乾固し、冷後30%硝酸2 mlおよび発色試薬10 mlを加えて20 mlメスフラスコに洗い出し水を標線まで加え

た。30%硝酸2 mlおよび発色試薬10 mlおよび水を加えて20 mlとした液を対照として410 nmにおける吸光度を測定した。一方、リン標準液で検量線を作成しておき、リンの量を求めた。試料ボートに付着したリンも同様の方法で測定した。

2) 測定結果¹⁵⁾

① 標準試料の分析

組成既知の含リン有機化合物について本法で測定したリンの定量結果を表1に示す。

② 臓器試料の分析

本法で臓器試料を分析すると、試料中のリンはリン酸化物として燃焼管内に一部、試料サンプリングボート内に残部が残留する。市販鶏生肝臓0.2-1.6 gについて測定すると、燃焼管内壁に付着したリンと、試料サンプリングボート内に残留したリン量との合計量は表2に示すようにリンの平均含量は0.28%、標準偏差0.06%であった。添加回収実験における回収率は次のようにして算出した。あらかじめ測定した肝臓試料中のリン量の平均値から新たに量り取った肝臓試料中のリン量を推定し、トリフェニールホスフィン等の有機元素分析用標準試料を鶏肝臓試料に添加して、燃焼分解後、測定したリン値から肝臓試料中の推定リン値を差し引いた残りを添加回収実験における回収値とした。表2に結果を示す。回収率を計算するとn=5で平均95.35%、標準偏差13.76%、相対標準偏差

表1 有機化合物中のリンの測定結果

Sample	weight/mg	P (%)		
		Calcd.	Found	Rec.,
STD-1	35.872	0.26	0.28	109
STD-2	16.372	0.71	0.70	98
STD-3	34.740	0.28	0.28	100
STD-4	45.820	0.19	0.19	100
STD-5	43.635	0.22	0.21	95
		\bar{x} : 100.4% δ : 5.2%		

STD-1 ~ STD-3 : triphenylphosphine + sodium tartrate dihydrate + sucrose
 STD-4 : C₂₄H₂₀O₁₀P + sodium tartrate dihydrate + sucrose
 STD-5 : C₁₀H₁₇O₁₀P + sodium tartrate dihydrate + sucrose

表2 鶏肝臓中のリンの測定および構造既知の有機化合物の添加回収結果

Nr.	Sample weight/mg	Liver/mg	Standard/mg	Added, %	P			
					Calcd., % †	Found, %	Error, %	Recovery, %
1	1611.4	5.47	—	—	—	0.34		
2	791.3	1.98	—	—	—	0.25		
3	675.8	1.55	—	—	—	0.23		
4	510.2	1.22	—	—	—	0.24		
5	264.0	0.95	—	—	—	0.36		
					\bar{x} =0.28%, δ =0.06%			
6	1125.4	3.15	0.47	0.04	0.32	0.29	-0.03	91
7	1120.1	3.14	0.40	0.04	0.32	0.34	+0.02	106
8	1031.8	2.89	0.22	0.02	0.30	0.34	+0.04	113
9	851.9	2.39	2.48	0.29	0.57	0.48	-0.09	84
10	785.0	2.20	0.46	0.06	0.34	0.28	-0.06	82
					\bar{x} =95.35%, δ =13.76%			
					R.S.D.=14.43%			

Nr. 1 ~ 5 : no added

Nr. 6 ~ 10 : triphenylphosphine + 2-amino-4,5-dimethylthiazole-HCl + s-benzylthiuronium chloride 0.4-2 mg was added.

† : Represented as the sum of 0.28% and the "standard added"

14.43%を示した。日本食品標準成分表¹⁶⁾によると鶏肝臓100 g中のリンは300 mgである。これは0.3%であるから本法による推定値もこれに近い値を示している。

③ 臓器燃焼におけるリン酸化物の挙動¹⁵⁾

本燃焼方式により試料を燃焼分解したとき、燃焼管内壁に付着するリン酸化物と、試料を量り取ったボート内に残留するリン酸化物の割合は、試料種別により異なる。鶏生肝臓試料について検討すると、試料量0.3-0.6 gとしたとき、試料ボートに残留して測定されたリンの量は試料から測定された全リン測定量の99.19% (n=5) を示し、残り1%弱が燃焼管内に付着した。試料量が1g以上になると燃焼管内壁に付着するリン酸化物の量が多くなり、サンプリングボート内に残留したリン酸化物は全リン量の70-80%を示した。この測定結果に關与する因子は、試料種別、量、燃焼の状態などが考えられる。しかし、試料量を0.6 gとして燃焼分解の条件を一定にしても燃焼管内壁に付着したリン酸化物の量と、試料サンプリングボート内に残留したリン酸化物の割合は試料種別により異なる傾向を示した。牛、豚、ラット等の肝臓生試料は卵黄、鶏皮、鶏砂肝と同様に大半のリン酸化物が試料サンプリングボート内に残留するが、鶏卵白は図5に示すように燃焼管内壁に付着するリン酸化物の割合が多い。鶏卵白にアデノシントリン酸ソーダ3水和物(2)を添加して燃焼すると、サンプリングボートに残留するリン酸化物

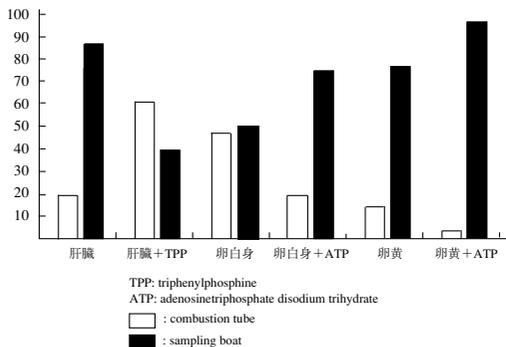


図5 生体組織と元素分析用標準試料およびアデノシントリン酸ソーダを添加して燃焼分解した試料により生じたリン酸化物の燃焼管内分布

は卵白のみを燃焼分解した場合に比べて多い。鶏生肝臓試料にトリフェニルホスフィン(1)を添加して測定すると燃焼分解した後のサンプリングボートから測定されるリン酸化物は、鶏生肝臓のみを燃焼分解した場合に比べ少なくなり、燃焼管内壁に付着するリン酸化物の割合が多くなった。(1)を単独で本法で分解すると、図6で示すように、ボート内に残留するリン酸化物の量は少なく燃焼管内壁に付着する量が多い。サンプリングしたボート内に残留するリン酸化物と、燃焼管内壁に付着するリン酸化物の割合は臓器試料と(1)をそれぞれ単独に測定した場合の和に近い分布を示し、燃焼管内壁に付着するリン酸化物の量が鶏肝臓だけを測定した場合より多くなる。KH₂PO₄をサンプリングボートに量り取って同様の操作によりリンの測定を行ったところ、その全量がボート内で回収された。(2)を同様の方法で測定を行ったところ、その98%がボート内から、残りが燃焼管内壁から測定された。アデノシンモノリン酸は(2)に比べ、燃焼管内壁から測定されるリン酸化物がやや多くなった。燃焼管内壁に付着したリン酸化物の割合は試料の構造特性につながる事が示唆される。

④ 燃焼管内壁におけるリン酸化物の分布

図7に本燃焼方式における燃焼管内のリン酸化物の分布を示した。臓器中のリンは爆発燃焼の場合を除き主として燃焼管内に残留するので、燃焼管末尾に連結した酸化分解ガスの吸収部では、リンの妨害を受けずハロゲン、硫黄の測定

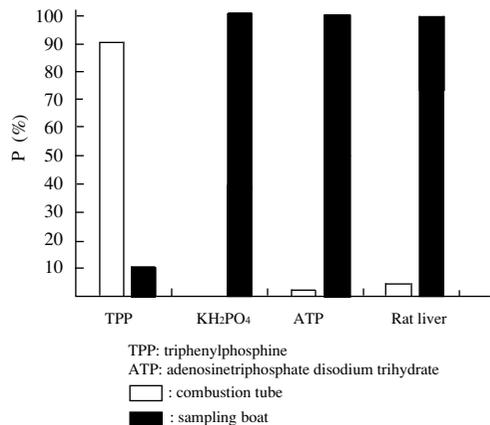


図6 標準試料と肝臓を燃焼したとき生じたリン酸化物の燃焼管内分布の割合

を行うことができる。

2. 塩素、硫黄

本法を用いて臓器試料を燃焼分解して、酸化分解ガス吸収部を燃焼管から取り外し洗い出して測定した。リンは試料サンプリングポートも含めた燃焼管内に残留し、燃焼管末に連結した蛇管部を含めた吸収部へ送られる酸化分解ガスは、試料中のリン酸化物とほぼ分離される。

1) 塩素の測定

生体のハロゲンとしては主として塩素とされている¹⁷⁾。しかし、ハロゲンのうち甲状腺のヨウ素の存在はよく知られているところであるので本実験では燃焼分解後の最終定量に各無機イオンの測定法を用いた。塩素イオンは0.002N硝酸水銀(50V/Vイソプロピルアルコール)で滴定する方法を用いた。

結果；市販鶏生肝臓からはn=5の平均は0.17% (標準偏差0.06%、相対標準偏差28.33%)の塩素が測定された。同様市販鶏生肝臓に、2-アミノ4,5ジメチルチアゾール硫酸塩、S-ベンチルチウロニウムクロライド等の構造既知の有機化合物を塩素として~0.15%添加して、本法により燃焼分解して塩素値を測定して、非添加の鶏生肝臓試料の平均値(n=5)を差し引くと平均0.03%、標準偏差は0.01%であった。

塩化ナトリウム溶液と有機塩素化合物を混ぜてサンプリングポート内にサンプリングし、本

法を用いて測定すると、塩化ナトリウムは試料サンプリングポート内に残留し有機塩素化合物中の塩素は酸化分解して蛇管内の吸収部から測定された。したがって、これらの鶏生肝臓から測定された塩素はNaCl型のものでないことが推定された。同様の方法でラット胃、脳、腎臓、肝臓、牛、豚の肝臓について塩素が推定され、これらは、非NaCl型の塩素であることが推定された。

2) 硫黄の測定

吸気管末にボールフィルター(木下式)を連結して、その先端を径約1cmの試験管内の10%過酸化水素水に浸しておく。試料を燃焼分解の後、吸収液は滴定フラスコ内に移す。洗液としては蒸留水1mlおよびイソプロピルアルコール4mlを用いた。ボールフィルター内はエアスプレーまたは注射筒を用いて圧力をかけ、洗液を洗い出した。吸収液及び洗液を合わせて、指示薬として0.2%アルセナゾⅢ溶液0.06mlを加え0.01N過塩素酸バリウムで滴定し、赤紫を帯びた点を終点とした。

臓器試料中の硫黄、塩素、リンの測定結果を表3に示す。本法により燃焼分解後、吸収液中の硫黄、塩素を測定してから燃焼管内に残留したリンを測定した。

3. ヨウ素の測定

鶏卵中の有機ヨウ素を定量する方法を検討し

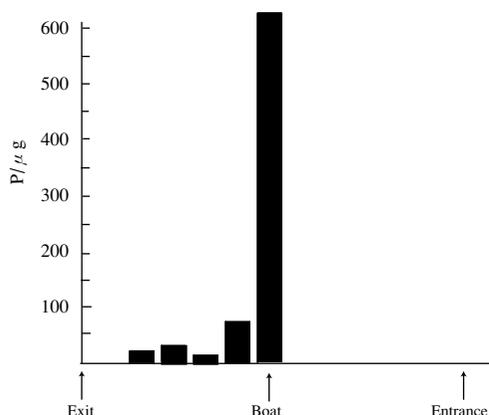


図7 燃焼管内におけるリン酸化物の分布

表3 鶏肝臓に標準試料を添加して燃焼分解し、硫黄、ハロゲン、リンを測定した結果

Sample weight/mg	element	Found/mg			
		Total (1)	added (2)	(1)-(2)	%
1125.4	S	1.96	0.60	1.36	0.12
	X	2.40	0.66	1.74	0.15
	P	3.24	0.47	2.77	0.25
1120.1	S	3.40	1.28	2.12	0.19
	X	3.06	1.41	1.65	0.15
	P	3.75	0.40	3.35	0.20
1031.8	S	2.00	0.66	1.34	0.13
	X	1.99	0.70	1.29	0.13
	P	3.51	0.22	3.29	0.32
785.0	S	2.06	1.06	1.00	0.13
	X	2.19	1.19	1.00	0.13
	P	2.17	0.46	1.71	0.22
851.9	S	2.50	1.35	1.15	0.14
	X	2.82	1.47	1.35	0.15
	P	4.09	2.48	1.61	0.19

(1): 総量、(2): 添加した標準試料中の元素量、(1)-(2): 肝臓中の元素量

2-Amino 4,5dimethylthiazole, S-Benzylthiuroniumchloride, Triphenylphosphate was added

た。試料を燃焼分解後の微量のヨウ素イオンをヨウ素酸イオンに酸化してからLeipertのヨード定量法¹⁸⁾で定量した。この方法によれば試料中のヨウ素1原子は1分子のヨウ素酸に相当し、滴定液中に6原子のヨウ素を生成するため微量のヨウ素の測定に有利である。本法により鶏卵中のヨウ素を測定したところ、卵白からは平均19 ppm (n=3)、卵黄からは0.25%のヨウ素が測定された。卵白に有機元素分析用標準試料o-ヨウ素安息香酸を添加して燃焼分解して測定すると有機ヨウ素の回収率は101%であった。

測定は次の方法によった。

吸収液として吸収管に10%水酸化ナトリウム溶液を流し入れ摺り合わせ部を燃焼管末端につなぐ(このとき摺り合わせ部にアルカリ分が付いていないよう注意する)。試料を燃焼分解後、吸収管を燃焼管から取り外して吸収管内を蒸留水約40 mlでフラスコ内に洗い出す。ブrom醋酸カリ氷醋酸溶液(醋酸カリ50 gを氷醋酸500 gに溶解した中に臭素2 mlを溶解した)10 mlを加えて栓をし、振り混ぜる。次にギ酸2、3滴を加える。ブromの色が消失したらメチルロート溶液(メチルロート0.15 gをN/100 NaOH 40 mlに溶解し、これを濾過し水を加えて100 mlとする)1滴を加えて確認する。

1:1 硫酸(硫酸を等量の水と混合する)1 ml および10%ヨードカリ5 mlを加える。ドライアイスジャーから二酸化炭素を滴定フラスコ内に送りながら、ヨウ素をN/500チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する。ヨウ素の色が薄くなったときに澱粉溶液を加えて青色が消失した点を終点とした。

計算: $N/500Na_2S_2O_3$ 1mlはヨウ素0.0423mgに相当する。

試料中のI量: $0.0423 \text{ mg} \times N/500 Na_2S_2O_3 \text{ ml} \times F$
 $F = N/500Na_2S_2O_3$ のfactor

4. フッ素の測定

フッ素を含有する薬物はすぐれた薬効を示すものが多く注目されている。その生体内挙動を研究する目的で臓器中のフッ素の簡易な測定法を検討した。

1) 予備的検討¹⁹⁾

鶏生肝臓を本法を用いて燃焼分解を行い、酸化分解したガスをアルカリで捕らえ、最終定量をLa-ALC法²⁰⁾による方法を用いて検討した。生体試料0.05-0.6 gに有機元素分析用標準試料p-フルオロ安息香酸0.1-2 mgを添加して燃焼分解したとき、平均回収率は97.99% (n=7)、標準偏差0.1688であった。また、段階的に処理した吸収液量に対する吸光度の変化を、最小二乗法により処理して鶏肝臓中のフッ素の存在を証明できた。

2) ラット肝臓中の有機フッ素の定量

予備的検討の結果、臓器生試料約0.3 gからppmオーダーでフッ素が測定された。臓器試料燃焼から生成が予測される H_2O 、 NO 、 NO_2 、 SO_2 、 SO_3 、 HCl などについては、使用したLa-ALC法への妨害はないと考えられ²¹⁾、実測の結果はこれを支持した。 CO_2 は吸収液をアルカリ性とするとは妨害するが吸収液を水とすると、本法による場合、酸化分解ガスが高温、高速で吸収部を通過するため吸収液中に残留せず、La-ALC法への妨害はない。リンは本法の場合、リン酸化物として燃焼管内に残留し、爆発性試料の場合を除き測定を妨害しない。灰分は一部揮発性酸化物を除き、燃焼管内のサンプリングポートに残留し、吸収部での測定を妨害しないと考えられる。

① 測定: 吸収部の蛇管は石英製を用いる。吸収液として蒸留水5 mlを用い、蛇管部は氷冷した。試料の燃焼分解後、蛇管部を燃焼管から取り外し、蛇管部を洗い出して、La-ALC溶液(ドータイトアルフッソン5 gを使用し先立ち水に溶かして100 mlにして用いた)2 mlとアセトン4 mlを加えて全量を20 mlとした。La-ALC溶液2 mlとアセトン4 mlに水を加えて全量を20 mlとした溶液を対照として90分後に620 nmの吸光度を測定した。

3) 実験結果と考察

① 標準試料の分析: スクロースにp-フルオロ安息香酸の微量を添加して試料を燃焼分解し、試料中のフッ素をフッ素イオンとして吸収部で捕らえて測定した。表4に結果を示す。スクロース10-20 mgを燃焼分解したとき、フッ素は検出されなかった。

4) 肝臓試料測定におけるフッ素測定値の検討

本実験では、試料を分解後の無機体化したフッ素の測定にLa-ALC法を試みたので、酸化分解した試料中のフッ素の測定が可能かどうか調べる目的で、ラット生肝臓試料0.1-0.5 gを燃焼分解してフッ素を測定した。結果を表5に示す。吸光度0.01-0.06付近の吸光度の測定値の精度を確かめるために、フッ化ナトリウム溶液（以下フッ素標準溶液とする）を用いて微量のフッ素イオン溶液の測定値を検討すると、図8に示すように有用性がなかった。また、フッ素イオンの一定量をあらかじめ数個のメスコルベンに入れ、微量のフッ素イオンを添加して吸光度の変化を見ると、0.9 μ g/ml以上は図9に示すようにバラツキがみられた。したがって、本実験では吸光度0.3-0.7の範囲に入るよう一定量のフッ素イオンを添加して、微量のフッ素イオンを測定することを目的として検討を行った。その結果、図10に示すように再現性の良い直線性が示された。したがって、ラット肝臓中のフッ素測定には、数個のメスコルベンに各一定量のフッ素標準液を入れておき、本燃焼法で試料を燃焼分解後、吸収液および洗液をあらかじめフッ素標準液の一定量の入ったメスコルベンに洗い込みLa-ALC法で測定した。フッ化ナトリウム標準液から作成した検量線からフッ素量を算出した。 S_{Ab} ：フッ素標準液+臓器試料を燃焼分解し洗い

表4 元素分析用標準試料中のフッ素の測定結果

Sample weight (μ g)	Fluorine		
	Calcd (μ g)	Found (μ g)	Recovery (%)
26304	26	29	112
13771	17	15	88
15124	14	14	100
17299	5	6	120
12797	1	1	100

sample; sucrose + p-fluorobenzoic acid \bar{x} : 104, R.S.D: 0.1185

表5 ラット肝臓を燃焼分解してフッ素をLa-ALC法 620 nmで測定した時の吸光度

Sample weight (g)	Absorbance (620 nm)
0.5284	0.089
0.2527	0.037
0.4009	0.032
0.2364	0.014
0.1581	0.010

出した吸収部洗液の吸光度

SL_{Ab} ：臓器試料のみを測定した時の吸光度

$(Ss)_{Ab}$ ：測定液中に添加されたフッ素標準液吸光度

$$S_{Ab} = SL_{Ab} + (Ss)_{Ab}$$

$$SL_{Ab} = S_{Ab} - (Ss)_{Ab}$$

添加したフッ素標準液の標準偏差から微量のフッ素イオンの検出可能領域を推定した。測定

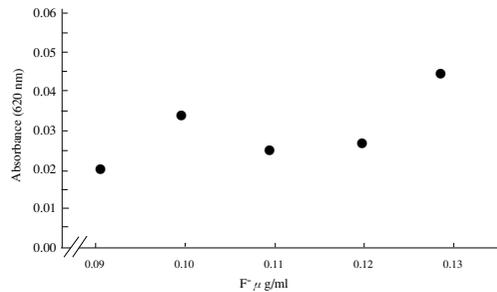


図8 La-ALC法 620 nmで測定したフッ素イオン 0.09-0.13 μ g/mlの吸光度

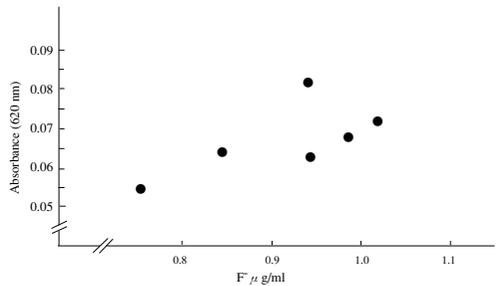


図9 La-ALC法 620 nmで測定したフッ素イオン 0.7-1.0 μ g/mlの吸光度

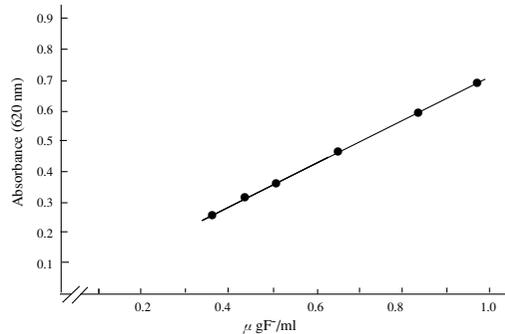


図10 La-ALC法 620 nmにおけるラット肝臓中のフッ素イオン測定における吸光度の検討

にあたってはアルフッソン溶液は毎回新しく調製し、添加したフッ素標準液の吸光度の標準偏差を算出して、 SL_{Ab} が標準偏差を超えた測定値を示したときフッ素測定値を有意として、検量線からフッ素測定値を測定した。

表6はラットの肝臓を数個のブロックに分けた。そしてそれぞれのブロックを2分した。各ブロックは均一であると仮定し、一方は肝臓片のみを測定のみを測定し、片方には肝臓片にフッ素値既知の有機標準試料を添加して測定に供した。計算値は各ブロック毎に、一方の肝臓片のみを測定した場合の測定値から、同一ブロック内、他方の肝臓片の測定値を推定し、これに添加した構造既知の有機試料中のフッ素計算値を加算した。

- F1: (臓器試料+添加した有機フッ素化合物)のフッ素値
- F2: 臓器試料のフッ素測定値
- F3: 添加した有機フッ素化合物中のフッ素理論値
- a: (生体試料+p-フルオロ安息香酸)を測定に供したときの生体量
- b: 生体試料だけを測定に供したときの生体試料量

$$\text{Recovery}\% = 100(F1 - F2/a/b)/F3$$

表6に測定値を示す

5) リンの妨害

リンは、主としてリン酸化物として、燃焼管内に残留し、吸収部への影響をさけることができる¹⁵⁾。脂肪を含む爆発性試料の場合は臓器中のリンは、リン酸化物として吸収部に付着し、測定値を妨害するので、爆発燃焼しないよう注意が必要である。

① サンプル誤差: 生体試料は湿重量のため、大気中で $-300 \mu\text{g}/\text{min}$ 前後の減量があった。しかしppmオーダーのため、100 mg以上の試料はとりだしてから30分以内の操作では測定値への影響は少ない。

② リンと灰分: 本法では同時にリンの測定が可能である¹⁵⁾。また、サンプルポート中に残留する灰分中の成分の測定が今後の興味ある課題として残った。

③ ムラサキイガイ (ムール貝) 中のフッ素とリン定量における知見²⁶⁾: リンの標準試料として供されたムラサキイガイ中のリンを測定する

表6 ラット臓器中のフッ素の測定結果

Nr	Calcd ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Found ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Recovery (%)
1	—	4	—
1"	11	13	117
2	—	15	—
2"	178	196	113
3	—	—	—
3"	47	38	82
4	—	11	—
4"	12	12	100
5	—	—	—
5"	26	26	100

1, 2, 3, 4, 5: liver,
1", 2", 3": liver + p-Fluorobenzoic acid
4": liver + haloperidol
5": liver + $\text{C}_6\text{F}_5\text{COOH}$ (alcohol solution)
Sample weight: 193–520 mg
Recovery, \bar{x} = 102%, R.S.D. = 13.45%

と同時にフッ素の測定も行ったところ、次の知見が得られた。この試料は多数の分析実験室でリンの定量値があらかじめ測定されていた標準試料であったため、本実験法の精度を確認する目的で試料の乾燥を重ねることにより示されたリンの定量値を得ることができた。しかし、同時に測定していたフッ素は乾燥を重ねる毎に測定値が低く出たので含フッ素成分の揮散が疑がわれた。乾燥過程の中で失われる成分を捕らえて測定することにより、さらなる試料についての情報が得られるものと考えられる。

5. 水分の測定値への影響

生体生試料は多量の水分を含む。約75%の水分を含むとして¹⁶⁾鶏生肝臓試料1gの試料乾燥質量は0.25 gである。本法では生の水分を含んだままの試料を用いた。これは試料サンプリング後、前処理なしですぐ燃焼分解して測定に供することができる簡便さと、前処理の過程で失われる成分がない有利さとのほかに試料中に含まれる水分が燃焼時OH基として²²⁾酸化分解反応を有利に進行されることを考慮したものである。しかし、生体から取り出したままの生の試料は微量天秤で秤量すると水分の減量が著しい。図11に湿度61%、温度23℃の天秤室内で市販の鶏生肝臓を秤量したときの減量を示す。実測値約0.3%であった鶏生肝臓試料中のリン含量への水分の減量による誤差の含まれた測定値を ΔR 、目的とする元素の測定値をEとすると試料サンプリング後、1時間以内であれば1時間あたり

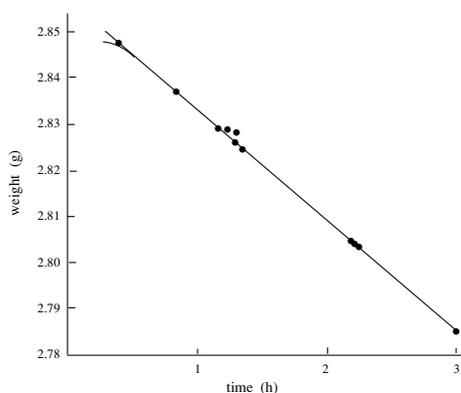


図11 大気中で測定した時の肝臓重量の減量 (サンプリングに用いた磁性ボートの重量: 1.770070g)、肝臓の重量=1g

の平均減量を a として図11から $a=24 \text{ mg/h}$ とすると ΔR は 0.307% となる。

$$\Delta R\% = \frac{E \times 100}{S - a}$$

$$\frac{E \times 100}{S} \quad \text{との差は } \Delta = 0.007\% \text{ となる。}$$

したがって、試料サンプリング後1時間以内であれば、 0.3% 含有のリンの場合、誤差は 0.007% 以内である。サンプリング後の測定を速やかに行うことが必要である。

6. 脂肪に富む臓器試料 (脳) の燃焼分解についての考察

脂肪に富む臓器試料の場合は、急激な温度の上昇からの酸化による爆発燃焼が起こらぬよう注意する必要がある。このため、脳のような脂肪に富む試料の場合は、約 0.3 ml の水を入れたボートを固定炉の位置に入れ、固定炉温の上昇でボート内の水分が酸化し、体積の急激な上昇で管内圧が上がって通気抵抗が起こり、完全酸化を量る方法を試みた^{23), 28)}。

V. まとめ

本法は未知の臓器試料中のリンについて試料特性に基づいた情報が得られることに特色がある。

多数の臓器試料を短時間に燃焼分解する目的では、ノズルを数個設けた燃焼炉がある⁷⁾。

本法はトレーサー実験への応用を試みたものである。特に脂肪に富んだ試料の場合は、通気ガスについて、さらに、検討を行う余地があるが、臓器試料中の硫黄、ハロゲンへの応用も可能であると考えられる。機器分析の検出限界が著しく進歩を続けている今日、有機試料を燃焼分解後の最終定量に更に進んだ検出法と結ぶことによって新しい分野の開拓も可能かと考える。燃焼法は人類太古の昔から用いられてきた方法であるが、高価な装置を必要とせず簡易に化学的方法に基づく物質の証明法として元素の絶対値を証明できる。

VI. 今後への課題

有機試料中に微量に含まれる鉄の定量について検討の結果、鉄はサンプリングボート内に残留し²⁴⁾、微量に含まれる硫黄、ハロゲンとの同時定量が可能であることが示された²⁵⁾。簡易でかつ高能率な本燃焼方式は有機試料を完全酸化に導く前処理法として用い、最終測定に感度の高い分析法と結んで、これまで明らかにされなかった分野、例えば、臓器中に分布するフッ素、硫黄、塩素などのほか有機体無機体微量元素などを明らかにしてゆくことができるのではないかと考える。また、硫黄、ハロゲンなどを指標にして薬物の長期服用による、体内の臓器への残留の実態も把握できるかと考える。

今回の実験では有機試料の添加回収実験結果を求めたが、今後、試料サンプリングボート内に残留する灰分の詳細な分析が可能になれば、さらに知見を深めることが可能かと思われる。最近では生体中に含まれる微量の金属の存在が生化学の分野で研究が進められている。Pregl¹⁹⁾は燃焼管で有機試料を燃焼分解して測定する際、試料を測定するサンプリングボート内に残留する金属元素について述べているが著者も本燃焼方式で有機試料中に微量に含まれる鉄と硫黄の同時定量が可能なることを確かめた^{24), 25)}。臓器試料への展開は今後の課題と考える。脂肪を多く含む試料への本法の適用は、通気ガスについての検討が残された今後の課題である。

謝辞

論文作成にあたり種々御指導を頂いた武蔵野

大学薬学部今井一洋教授に感謝申し上げます。

本研究は東京大学薬学部薬品代謝化学教室で行ったもので、実験に種々ご便宜と御指導を戴いた広部雅昭名誉教授に深謝申し上げます。また、試料をご提供いただき、実験を行うに種々ご便宜を頂いた薬品代謝化学教室の各位に感謝します。

本研究に終始御指導を頂いた故阪本秀策博士に感謝します。

電気炉をご提供いただいた故久道富美子先輩に感謝します。

文 献

- 1) 基礎生化学実験法5; 化学的測定: 阿南功一, 紺野邦夫, 田村善三, 松橋通生, 松本重一郎編: 丸善, 東京, (1979)
- 2) H. Roth: "Pregl/Roht Quantitative Organische Mikroanalyse", Druck von Adolf Holzhausens Nfg., Wien, (1958)
- 3) 馬場芳子: 新しい薬学の研究の流れの中で第2次大戦後50年の有機元素分析の足跡を考察する(第2報). 薬史学雑誌, 33: 122-126, 1998.
- 4) 馬場芳子: 新しい薬学の研究の流れの中で第2次大戦後50年の有機元素分析の足跡を考察する(第3報). 薬史学雑誌, 35: 144-152, 2000.
- 5) W. Pfab: Erfahrungen mit eiger neuen Schnellmethode zur Mikro-C-H-Bestimmung. Z Anal Chem, 187: 354-362, 1962.
- 6) 阪本燿策, 馬場芳子: 有機微量分析におけるノズル式燃焼方式の効率及び有機微量成分分析への応用. 分析化学, 21: 1087-1093, 1972.
- 7) Baba S, Baba Y, Konishi T: A New Combustion System for Rapid Preparation of Biological Samples for liquid Scintillation Counting. Anal Biochem, 66: 243-252, 1975.
- 8) 阿南功一: 基礎生化学実験法5; 化学的測定, 129, 丸善, 東京, (1979)
- 9) 馬場芳子: 新しい薬学の研究の流れの中で第2次大戦後50年の有機元素分析の足跡を考察する(第1報). 薬史学雑誌, 32: 206-210, 1997.
- 10) G. Kainz und F. Scheidl: Die Verbrennung an einer Duse, eine sehr wirksame Oxydations method for die Bestimmung von Kohlenstoff, Wasserstoff, Fluor, Chlor, Brom, Jod, Schwefel und Phosphor in organischen Verbindungen. Mikrochim Acta, 1964/4: 998-1018, 1964.
- 11) 有機微量分析研究懇談会編集; 編集責任者穂積啓一郎: 有機微量定量分析. 奈良明雄, 383-411, 南江堂, 東京, (1961)
- 12) 有機微量分析研究懇談会編集; 有機微量定量分析付録有機微量分析用器具規格図集(第1集)15-16の計泡器部分を用いた. 南江堂, 東京, (1961)
- 13) 有機微量分析研究懇談会編集; 有機微量定量分析付録有機微量分析用器具規格図集(第1集), 24, SMA-WA-3の形状で磁製長さ2 cm, 幅0.7cm, 高さ0.7cmのもの. 南江堂, 東京, (1961)
- 14) H. Roth: "Pregl/Roht Quantitative Organische Mikroanalyse", 138, Abb6, b, Druck von Adolf Holzhausens Nfg., Wien, (1958)
- 15) 馬場芳子: ノズル式燃焼法による臓器の燃焼条件とリン酸化物の挙動. 分析化学, 39: 445-449, 1990.
- 16) 永岡書店編: 標準食品成分表一四訂一, 91, 永岡書店, 東京, (1983)
- 17) 不破敬一郎編: 生体と金属, 19-23, 講談社, 東京, (1982)
- 18) 落合英二, 津田恭介, 阪本燿策: 有機定量分析法微量篇, 131, 南江堂, 東京, (1956)
- 19) 馬場芳子: ノズル式燃焼法による有機微量分析研究. フッ素定量知見, 第3報, 生体試料中の有機フッ素定量についての基礎的検討. 第52回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会シンポジウム講演要旨集: 16-20, 1985
- 20) 橋谷 博, 吉田秀世, 武藤 博: アリザリンコンプレクソンを用いる痕跡フッ素の簡易光度定量. 分析化学, 16: 44-46, 1967.
- 21) 平野四蔵, 藤沼 弘, 笠井寿二: アリザリンコンプレクソンを用いる微量フッ素の抽出光度定量. 分析化学, 15: 1339-1344, 1966.
- 22) 疋田 強, 秋田一雄: 標準応用化学講座19, 燃焼概論. 32-49, コロナ社, 東京, (1978)
- 23) 馬場芳子: ラット脳中のフッ素定量法検討. 日本分析化学会第40年会講演要旨集, 333, 1991.
- 24) 馬場芳子: ノズル式燃焼法を用いたポリマー中の鉄の定量-原子吸光法との接点における考察. 第53回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会シンポジウム講演要旨集. 27, 1986.
- 25) 馬場芳子, 阪本燿策: ノズル式燃焼法による有機物中の少量成分分析-鉄と硫黄の同時定量. 第54回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会シンポジウム講演要旨集. 20, 1987.
- 26) 馬場芳子: 簡易な酸素噴射式燃焼法-La-ALC h法を用いるNIESムール貝(ムラサキイガイ)標準試料中のフッ素定量における一知見. 日本分析化学会第42年会講演要旨集. 346, 1993.
- 27) 落合英二, 津田恭介, 阪本燿策: "有機微量定量分析, 微量篇". 121, 南山堂, 東京, (1956)
- 28) 馬場芳子: ラット脳中のフッ素とリンの定量における一知見. 第53回分析化学討論会講演要旨集, 219, 1992.