

電子スピン共鳴法を用いた亜硫酸イオンの定量法

著者	南方 かよ子, 野澤 秀樹, 渡部 加奈子, 鈴木 修, 鈴木 加奈子
雑誌名	法中毒 = Japanese journal of forensic toxicology
巻	21
号	2
ページ	144-145
発行年	2003-05-31
URL	http://hdl.handle.net/10271/1742

G-12

電子スピン共鳴法を用いた亜硝酸イオンの定量法

浜松医大・法医 ○南方かよ子、野澤秀樹、鈴木(渡部)加奈子、鈴木修

Determination of nitrite by use of ESR method

Kayoko Minakata, Hideki Nozawa, Kanako Watanabe-Suzuki and
Osamu Suzuki

Department of Legal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine

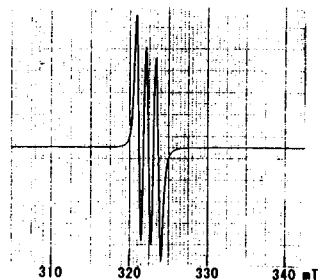
【目的】

硝酸、亜硝酸化合物は血管拡張剤、肉製品の発色・防腐剤、肥料、火薬等さまざまに用いられている。また最近では亜硝酸塩はドーピング薬物の検知を妨害するために、商品名 Klear(KNO_2)や Whizzies(NaNO_2)として尿に添加された報告もある。亜硝酸は酸化により硝酸となり、還元により NO となるため、これら 3 物質の定量法は関連している。亜硝酸は弱い還元剤であるアスコルビン酸、ヨウ素(I)、バナジウム(V^{3+})により室温で容易に NO となる。亜硝酸を NO として検出する方法としては、NO をヘリウムガスにより、 NO_x 検出器に導き定量するケミルミネッセンス法がある。また、NO がラジカルである点を利用した方法としては、ヘモグロビンをカラムにつめて脱気した後に、NO をヘモグロビンにトラップさせ、77K に凍結後、電子スピン共鳴(ESR)法にて測定する方法がある。この方法では空気を遮断しなければならず、また、凍結した高分子試料 ESR スペクトルは特徴的な超微細分裂を示さないという欠点がある。

我々は NO と鉄との親和性が非常に大きいこと、NO がラジカルであることに着目した。亜硝酸の還元により生成した NO はそのまま放置しておけば水溶液中で種々の物質と反応したり、気体として飛散したりする。また NO と鉄との反応物も水溶液中では安定ではない。従って、鉄とジエチルジチオカルバミン酸(DDC)との錯体を水よりも軽い有機溶媒中に作り、水と分離した有機層中の鉄によって NO をトラップし、ESR 法により定量することとした。

【方法】

1. 鉄-DDC 錯体を種々の有機溶媒に溶解し、トラップされた NO の量および安定性を種々の有機溶媒で比較した。結果はシクロヘキサノールが最良であった。
2. シクロヘキサノール中の鉄濃度は 2mM、DDC 濃度は 10mM が最適であった。鉄の 1/20 濃度の NO までは定量的にトラップ可能であることを確認した。
3. 還元剤として、アスコルビン酸を使用した。亜硝酸の濃度が 0.35 μM から 100 μM のいずれであっても水溶液中のアスコルビン酸濃度は 0.1M 以上が適当であった。



4.測定手順は、水溶液試料に鉄-DDC 錯体を溶解したシクロヘキサノールとアスコルビン酸溶液を順次加え、NO をトラップしたシクロヘキサノール層を遠心により分離する。このシクロヘキサノール層をヘマトクリットキャピラリーにいれ、ESR 装置にて NO を定量する。1 試料 5 分で測定は終了する。

【結果】

図にシクロヘキサノール中の鉄-DDC にトラップされた NO の室温における ESR スペクトルを示す。等強度・等間隔の 3 本の吸収線からなり、窒素上に(ある割合の)電子が存在していることが判る。それらの線の間隔(超微細分裂)は 1.26mT であり、中心の線の g 値は 2.040 である。図は 10ng の NO_2 に相当しており、検出限界はこの 1/100 の量の 0.1ng である。報告されている亜硝酸の種々の検出方法の検出限界はナフチルエチレンジアミンを用いた吸光度法、4-ヒドロキシクマリンを用いた蛍光法、ケミルミネッセンス法で、それぞれ 40, 10, 1 ng である。本方法では水溶液中の NO をシクロヘキサノール層へ抽出する方法を採用しているため、容器の形状を工夫すれば、100 倍の濃縮も可能である。このようにして抽出された NO は空気を遮断した状態では室内光、室温の下で、30 日間でも安定であった。

【SUMMARY】

A simple and sensitive method for the determination of nitrite has been developed. Nitrite can easily be reduced to NO radical by weak reductants such as ascorbic acid, I^- and V^{3+} at room temperature. Some NO detection systems, already applied to the quantitation of nitrite, are chemiluminescence assay and ESR assay at 77 K after the trapping NO by hemoglobin. Our ESR method is based on the trapping NO by a metal-chelator complex consisting of ferrous ion(Fe^{2+}) and diethyldithiocarbamic acid(DDC) in cyclohexanol. The complex $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-(DDC)}_2$ shows a characteristic three-line hyperfine structure($a_N = 1.26 \text{ mT}$) with g value of 2.040 at room temperature. One sample can be quantitated within 5 min. When the sample tube was sealed from air with patty, the signal intensity remained constant for 30 days under room light at room temperature. By use of the present ESR method, NO at the concentration from 0.35 μM to 100 μM in 6 μl of cyclohexanol is quantitated with the detection limit of 0.1 ng.