HamaMed-Repository
浜松医科大学学術機関リポジトリ
浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

電子スピン共鳴を用いた銅の微量定量法

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 日本法中毒学会 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 南方, かよ子, 野澤, 秀樹, 渡部, 加奈子, 鈴木, 修, 鈴木, 加奈子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1732

G-34　電子スピン共鳴を用いた銅の微量定量法

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

Sensitive quantification of copper using ESR method

Kayoko Minakata, Hideki Nozawa, Kanako Watanabe-Suzuki and Osamu Suzuki
Department of Legal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine

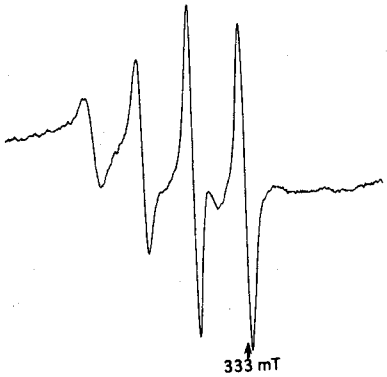
【目的】

銅を含んだ蛋白質セルロプラスミンは、血漿中で最も抗酸化に寄与している蛋白質として報告されている。一方、遊離銅およびメタロチオネインに結合した銅はOHラジカル等の活性酸素種を発生し、組織に過酸化障害を及ぼすと報告されている。薬毒物によって血漿や組織中の銅レベルは大きく変化する。銅を急性中毒レベルで摂取することは現在ではほとんどないが、環境汚染によって、慢性的に有害なレベルにまで摂取する危険性は残されている。

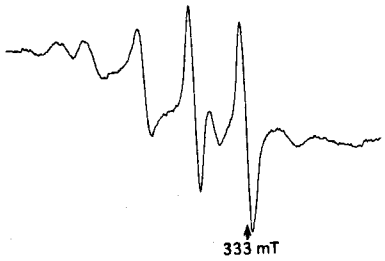
銅の簡便な定量には分子吸光法と原子吸光法がある。バソクプロインスルホン酸は銅のみに特異的なキレートであるが、その吸収極大は480nmであるので、黄色を呈し、生体成分と区別がつけ難く、さらに吸収も非常に強いわけではない($\varepsilon=1.3\times10^4$)。原子吸光法においても銅に特有な324.7nmの吸収はあまり強くはない。従って、これらの方法では血清中の銅は1 μg/mlと比較的高濃度であるにもかかわらず、定量には血清が2 mlも必要とされる。電子スピン共鳴（ESR）法を用いて簡便に感度よく銅を定量する方法について検討した。

【方法】

Cu^{+}は反磁性であるがCu^{++}は常磁性であることを利用して、Cu^{++}をESR法で定量できるよう種々の条件を検討した。Cu^{++}を安定な状態に保つため、キレートとして強力なジエチルジチオカルバミド（DDC）を選んだ。DDCは0から10の広いpH領域で銅と錯体を形成することができるが、生体内の銅は蛋白や種々の低分子化合物と結合しているので、銅を遊離させるため、試料のpHは0～1.5になるようにした。1～10μlの微量の試料を測定するために、試料を直接ESRセルに入れるのではなく、ヘマトクリット管に入れ、上下をパテで封をし、それを、ESRセルに入れて測定した。この操作により、正確、かつ迅速に測定が可能となった。錯体は0から10のpH領域内で多くの有機溶媒によって抽出可能であるが、封をするパテを溶解しない溶媒として、1-ブタノールを用いることとした。また、1-ブタノールで抽出する際、Na_2SO_4を水層に飽和



copper standard solution



plasma

させると、抽出が完全になることを確かめた。また DDC との結合が強いため、EDTA その他のキレートによる妨害はなかった。

【結果】

図に 1 - ブタノール中の銅 - DDC 錯体の ESR スペクトルを示す。左は銅の標準液、右は血漿のスペクトルである。8mT の銅の超微細分裂による 4 本線が観測される。この 4 本線の中心磁場から、g 値は 2.047 である。定量には 333mT の磁場のピークの高さを用いた。血漿、灰化した組織共に、妨害する物質がなく、血漿の場合 5 μl、肝臓の場合は湿重量 1 mg で定量可能である。1 つの血漿の定量には 5 分を要するが、2 4 サンプルをまとめて処理すれば 1 時間で定量できる。またこの錯体は操作中の室内光には影響をうけず、また遮光して保存すれば、3 日後でも同一値を示した。

【SUMMARY】

Both colorimetric method using bathocuproine and atomic absorption spectrophotometric method require even 2 ml of serum for the quantification of copper. Therefore, much more sensitive but convenient method is needed for the quantification of small amount of copper in polluted water, food, blood and tissues.

The application of ESR method is examined in the present work because Cu^{++} is paramagnetic and can be measured by ESR method. We confirmed the results of the previous report that diethyldithiocarbamate (DDC) reacted with Cu^{++} at pH from 0 to 10. The Cu^{++}-DDC complex could be extracted with most organic solvents at these pHs. We found that the addition of Na_2SO_4 facilitated the extraction of the complex with 1-butanol. By this method we can quantify copper using 5μl of plasma within 5 min. Cu^{++}-DDC complex in butanol is quite stable and is not affected by a few hour's exposure to room light. The peaks remained unchanged for 3 days when it is kept in the dark and the volume of butanol maintained.