

## 技術報告

水酸化テトラメチルアンモニウム分解/黒鉛炉原子  
吸光法による生体試料中のルテニウムの定量田村久恵<sup>®\*1</sup>, 新井隆己<sup>\*2</sup>, 長瀬光昌<sup>\*3</sup>, 一瀬典夫<sup>\*4</sup>

(1991年9月14日受理)

交流ゼーマン補正黒鉛炉原子吸光法を用いて、ルテニウムレッドかん流により染色したじんの糸球体基底膜 (glomerular basement membrane, 以下 GBM と略記) 中のルテニウムの定量法を検討した。試料 1 ml を 25% 水酸化テトラメチルアンモニウム (tetramethylammonium hydroxide, 以下 TMAH と略記) 1 ml で分解後、水で希釈して 10 ml とし、2.5% の TMAH 溶液とした。検量線溶液はルテニウム標準溶液を試料溶液と同じ TMAH 濃度に調製した。黒鉛炉の使用回数が増えれば測定値の吸光度に負の影響を与えるが、ピーク面積積分値の場合は比較的小さい。相対標準偏差値 (RSD) を 4% (ピーク面積積分値 0.32 において) 以内にとどめる使用回数は約 110 回であり、この範囲内のピーク面積積分値の減少は 10% 以下であった。前処理操作で使用し残存する生理食塩水のナトリウムによるバックグラウンド吸収の補正は、最適な灰化温度を設定することにより抑制できマトリックス修飾剤の添加は必要としなかった。本法の分析感度は 40.4 pg, 検出限界は 5.5 ppb, 10 回の繰り返し測定精度は 0.9%, 10 分おきに 30 回繰り返し測定した再現性は 5.2%, 5 日おきに 3 回繰り返し測定した再現性は 3.7%, 回収率は 91~109% であり、任意の 1 群の試料 5 検体を分析した GBM 結合ルテニウムの定量結果は  $56.1 \pm 5.8 \mu\text{g mg}^{-1}$  GBM protein, RSD 10.3% であった。

## 1 緒 言

ルテニウムレッド  $[(\text{NH}_3)_5\text{Ru}-\text{O}-\text{Ru}(\text{NH}_3)_4-\text{O}-\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Ruthenium oxychloride ammoniated) は、生理的条件下では陽電荷を有する無機染色物質で、生体試料の肺、心、小腸、軟骨などの陰電荷部位の染色に使用されており、組織標本の形態学的観察に有用である<sup>1)</sup>。GBM の陰電荷部位もルテニウムレッドで染色される。染色された GBM に結合しているルテニウムの定量が可能となれば、組織標本の形態学的な観察に加えてじん臓病の病態解明に有効な方法になり得ると考えられる。本研究において著者らは、ルテニウムレッドでラットのじん臓をかん(灌)流染色し、黒鉛炉原子吸光法により GBM に結合しているルテニウムを定量する方法の確立を試みた。

ルテニウムは通常の有機物分解法である乾式灰化や硝酸/過塩素酸を用いる湿式法でタンパク分解すると、分解過程で気化することが知られている<sup>2)</sup>。そこで、著者らは TMAH によるアルカリ分解<sup>3)~5)</sup>を試みた。本法によれば、タンパク分解過程でルテニウムを揮散させることなく、共存元素の影響を受けずに、高い感度で再現性よく、黒鉛炉原子吸光法でルテニウムを定量することができた。最適定量条件を決定するために、灰化、原子化条件、検出限界、再現性、化学干渉などを検討した。本法の正確性の確認は標準試料がないため、標準添加法と回収率測定で行った。

## 2 実 験

## 2.1 装 置

原子吸光分析装置は Perkin-Elmer 製 Zeeman 5100PC 型原子吸光度計に HGA-600 型グラファイトファーネスと AS-60 型オートサンプラーを取り付け、光源は浜松ホトニクス製ルテニウム中空陰極ランプ、黒鉛炉はパイロコートグラファイトチューブを用いた。

## 2.2 試 薬

ルテニウム標準溶液は、Aldrich Chemical Company,

\*1 静岡県静岡工業技術センター: 421-12 静岡県静岡市牧ヶ谷 550

\*2 浜松医科大学医学部第一内科: 431-31 静岡県浜松市半田町 3600

\*3 帝京大学医学部第一内科: 173 東京都板橋区加賀 2-11-1

\*4 浜松医科大学医学部化学教室: 431-31 静岡県浜松市半田町 3600

Inc. 製の原子吸光分析用標準溶液 (Ru: 1030 ppm) を水と 25% TMAH で適宜希釈して用いた。TMAH は多摩化学工業製の TAMAPURE-AA1000 分析用超高純度試薬 [(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NOH: 25%] を用いた。水は純水製造装置 (ヤマト科学製オートスチール WA550 と Barnstead 製 E-pure 3) で精製した蒸留-イオン交換水を、黒鉛炉に用いるパージガスには純アルゴン B (99.999%) を用いた。

Table 1 Protocol for analytical procedure of GBM

Rat	
	Cannulation
	Hanks balanced salt solution, 2 min
	0.2% Ruthenium red 3 ml min <sup>-1</sup> 25 ml
Kidney	
	Sieving method 80, 150, 270 mesh
Glomerulus	
	* { addition of 0.9% saline, 12 ml
	centrifugation: 1000 ppm, 15 min
	decantation
	repeat (*)
	** { addition of 0.9% saline, 12 ml
	ultra sonication, 4 min
	centrifugation: 3000 ppm, 15 min
	decantation
	repeat (***)
Glomerular basement membrane (GBM)	
	sampling
	addition of distilled water, 2.5 ml
Sample solution	
	1.5 ml for determination of protein
	1 ml for determination of solubilized Ruthenium
	25% tetramethylammonium hydroxide (TMAH) 1 ml
Graphite furnace-AAS	

Table 2 Operating parameters

Atomic absorption spectrophotometer			
Wavelength	349.9 nm		
Spectral band width	0.2 nm		
Integration time	5 s		
Graphite furnace <sup>a)</sup>			
Step	Temp/°C	Ramp time/s	Hold time/s
Drying	120	10	50
Ashing	1200	10	20
Atomizing	2500 <sup>b)</sup>	0 <sup>c)</sup>	5
Cleaning	2600	1	5

a) 10 μl sample injection by AS-60 Auto Sampler;  
b) purge gas stop; c) maximum power mode

### 2・3 実験操作

Table 1 のプロトコールに従い、ルテニウム結合 GBM を採取し、水 2.5 ml に分散溶解させたものが試料である。このうち 1 ml をルテニウム定量用、1.5 ml をタンパク定量用<sup>6)</sup>とした。試料 1 ml に TMAH 1 ml を加え軽く手で振り混ぜることにより、ルテニウム結合 GBM 懸濁液より透明な薄赤色溶液を得た。その後、水で希釈して 10 ml とした。この溶液の 10 μl をオートサンプラーを用いて黒鉛炉内に注入し、Table 2 の分析条件で吸光度を測定した。

## 3 実験結果と考察

### 3・1 TMAH 濃度の影響と検量線

TMAH 濃度によるルテニウム吸光度への影響を確認するために、ルテニウム標準溶液を TMAH と水で 200 ppb に調製し、このときの TMAH 濃度を 0~12.5% まで変化させてルテニウム吸光度を測定した。Fig. 1 に示したように TMAH 濃度の増加による吸光度の影響は、ピーク面積積分値ではピーク高さ値に比較し小さいが、わずかに減少する傾向を示すため、検量線は試料と同じ TMAH 濃度の標準液を使用し作成した。ルテニウム標準溶液の 103~440 ppb を原子化させて得られた検量線はピーク面積積分値は 0.12~0.46 で良好な直線関係を示したが、ピーク高さ値では 0.19~0.68 となり高濃度になるに従い吸光度はやや低下した。

### 3・2 黒鉛炉の使用回数の影響

多数の試料を一度に測定、比較する必要があるときは、同一検量線を用いて定量できる条件設定を考慮しなくてはならない。そこで、ルテニウム標準溶液 250 ppb を用いて、黒鉛炉を連続使用した場合の測定回数と吸光

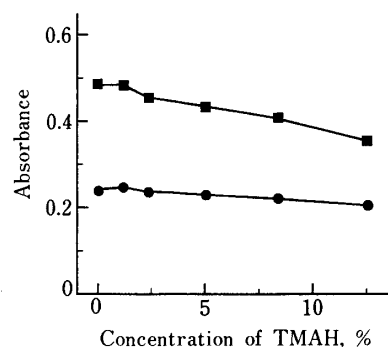
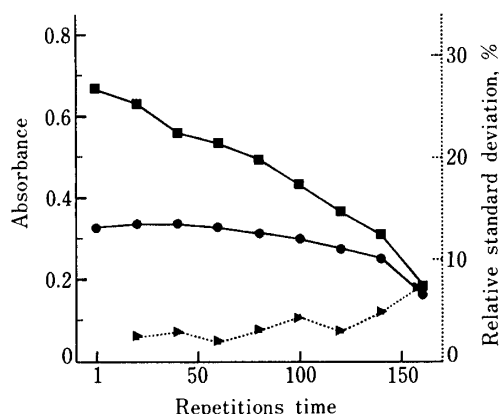


Fig. 1 Effect of TMAH concentration on the absorbance for ruthenium  
●: peak area; ■: peak height



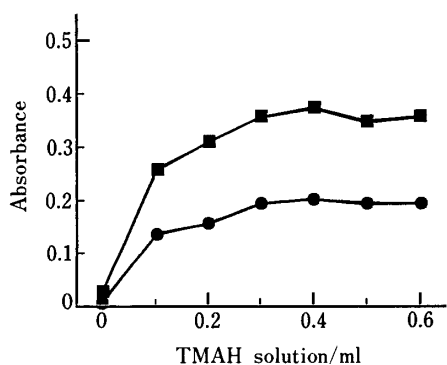
**Fig. 2** Effect of repeated use of graphite furnace on the absorbance of ruthenium

●: peak area; ■: peak height; ▲: relative standard deviation for peak area

度の関係を調べた。20回測定ごとの吸光度の平均値とRSDを求めた結果、Fig. 2に示したように吸光度を10%減少させる連続使用回数は、ピーク面積積分法で110回、ピーク高さ法で30回であった。この範囲内のRSDは共に4%以内であった。従って、本実験では黒鉛炉の劣化の影響が小さいピーク面積積分値を用いた。

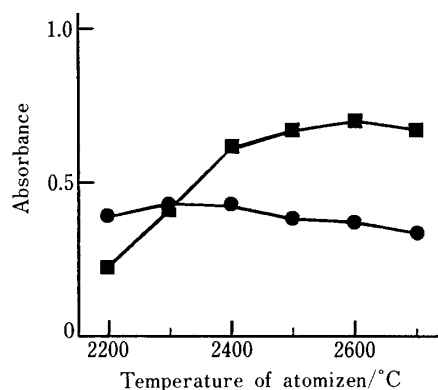
### 3.3 試料分解必要量

生体試料の分解に必要なTMAH添加量を検討するため、3検体分の試料を採取直後に混合シタンパクを十分に分散させながら0.5mlずつ分取した。TMAH 0~0.6mlで分解後、各溶液を水で希釈して10mlとし測定した結果をFig. 3に示した。TMAH量が0.3~0.6mlの



**Fig. 3** Effect of volume of TMAH on the absorbance for ruthenium

●: peak area; ■: peak height; TMAH: 25%; Ru: 150 ppb



**Fig. 4** Effect of atomization temperature on the absorbance of ruthenium

●: peak area; ■: peak height

範囲では一定の吸光度であった。この結果を考慮し、以後の実験では、分解は試料量1に対してTMAH量1の比で使用することにした。

### 3.4 原子化条件の検討

原子化条件の検討は試料液を用いて原子化温度と吸光度の関係を求めた (Fig. 4)。ピーク面積積分値は2200~2700°Cにおいて比較的安定した吸光度であった。吸光プロファイルは、2300°Cまでは最高ピーク位置が不明確でベースラインへの戻りが悪かったが、2400°C以上では温度の増加と共にそのピーク幅が狭くなり最高ピーク位置は明確になっていった。ピーク高さ値の場合は、2400°Cまで吸光度の増加が続き2500°C以後はほぼ一定であった。ルテニウムのピークは0.5sから現れ、0.8sで最高ピーク位置を示し、4sでベースラインに戻る。これらの結果から、最適原子化条件は原子化温度を2500°C、ランプ時間は0s、保持時間は5sとした。

### 3.5 共存元素の影響と灰化条件の検討

試料液を用いて灰化温度と吸光度の関係を調べた。結果はFig. 5に示したようにピーク面積積分値、ピーク高さ値ともに600~1800°Cにおいて一定した吸光度が得られ、妨害マトリックスは認められなかった。

次に、ルテニウム濃度が低くて希釈できない試料中のナトリウム濃度を測定したところ、20~200 ppm共存しており一定しないことが分かった。又、デカンテーション中に、液中に逸失するルテニウム濃度を確認する必要もあり、Table 1のプロトコールで使用した生理食塩水の影響を検討した。ルテニウム標準液濃度は300 ppb

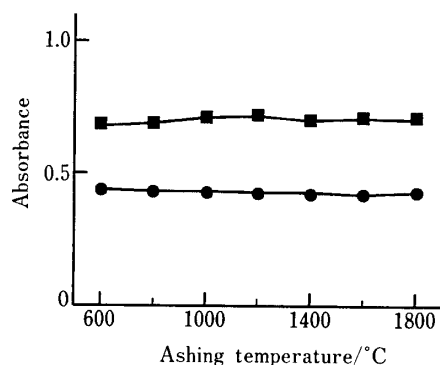


Fig. 5 Effect of ashing temperature on the absorbance of ruthenium

●: peak area; ■: peak height

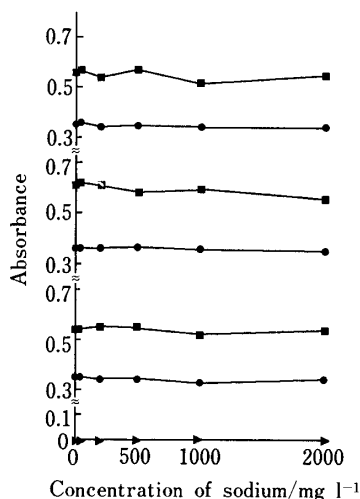


Fig. 6 Effect of concentration of sodium and ashing temperature on the absorbance of ruthenium

●: peak area; ■: peak height; ▲: peak area and peak height of blank value. Ashing temperature: (1) 1000°C, (2) 1200°C, (3) 1400°C

とし、ナトリウム添加濃度を 0~2000 ppm, 灰化温度を 1000~1400°C に変化させて吸光度を測定した。

ナトリウムによるバックグラウンド吸光プロフィールを確認すると、ナトリウムは 0.2 s から現れ、0.4 s で最高ピーク位置を示した。そして 1.9 s と 2.8 s にも小さなピークが現れる多重ピークであった。灰化温度 1000°C ではナトリウム共存濃度 1000 ppm 以上で、バックグラウンド吸光プロフィールが認められた。しかしバックグラウンド補正された吸光度は、Fig. 6 に示したように灰化温度 1000~1400°C においては、ナトリウム添加濃度を 0~2000 ppm まで変化させてもピーク面積積分値であ

れば、ほぼ一定の吸光度を示した。

ナトリウム溶液 0~2000 ppm によるそれぞれのから試験値は、どの灰化温度においてもピーク高さ値、ピーク面積積分値ともに 0.003 以下であった。

ランプ時間、保持時間は通常の試料ではそれぞれ 1 s 以上で、ナトリウム濃度が高い試料では 5 s 及び 15 s 以上で一定の吸光度を示した。

以上の検討結果より、ナトリウムによる影響はバックグラウンド補正されており、最適な灰化温度を設定することで更に抑制できることが分かった。最適灰化条件は温度を 1200°C, ランプ時間を 10 s, 保持時間を 20 s とした。

### 3.6 感度及び検出限界

感度は、250 ppb のルテニウム標準液 10  $\mu$ l をとり原子化させたときに得られたピーク面積積分値から、1% 吸収を示す値に対するルテニウム量で求めた。結果は 40.4 pg であった。

検出限界は、対照群ラット 4 検体を 10 回繰り返し測定したときのピーク面積積分値の標準偏差 (SD) を求め、これを 2 倍して 5.5 ppb とした。

### 3.7 繰り返し精度及び再現性の検討

ルテニウム濃度 230 ppb の試料を 10 回繰り返し測定した結果は、ピーク面積積分値が 0.26 であり、RSD は 0.9% であった。10 分おきに 30 回繰り返し測定したとき、及び 5 分おきに 3 回測定したときの再現性は、ピーク面積積分法の場合 RSD として 5.2% 及び 3.7% であった。

### 3.8 検量線法及び炉中標準添加法による測定結果の比較

2 検体の試料を炉中標準添加法及び検量線法で 5 回ずつ繰り返し測定し、その測定濃度についての結果を Table 3 に示した。ルテニウム標準溶液による検量線法及び炉中標準添加法による結果に有意差は認められず、

Table 3 Comparison of calibration and standard addition methods

Method	Sample	Mean $\pm$ SD, ppb	RSD, %
Calibration	1	199 $\pm$ 3.7	1.8
	2	363 $\pm$ 2.7	0.7
Standard addition	1	200 $\pm$ 7.7	3.8
	2	366 $\pm$ 9.7	2.6

Table 4 Recovery of ruthenium added to the samples

Sample No. <sup>a)</sup>	Ru conc. in sample/ng	Ru recovered <sup>b)</sup> /ng	Recovery, %
1	0.17	0.96	93
2	0.18	0.93	91
3	2.44	1.04	101
4	2.93	1.02	99
5	2.83	1.13	109
6	2.78	1.00	97

a) control rats: sample No. 1, 2; Experimental rats: sample No. 3~6; b) Ru: added 1.03 ng

ルテニウムの損失やマトリックスの影響がなく検量線法での定量が可能であることを示していた。

#### 4 分析結果

任意の 1 群の試料 5 検体を用い, 検量線法で GBM 結合ルテニウムを定量した結果を Table 5 に示した。この試料群のルテニウムの平均分析値は,  $56.1 \pm 5.8$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  GBM protein であり, RSD は 10.3% であった。

以上より, 本法による糸球体基底膜の陰電荷の定量的検討が可能であることが示された。又, この方法と電顕による観察を併用することにより, タンパク尿下の基底膜の陰電荷をより詳しく検討することが可能になると考えられる。

本研究を行うに当り多くの御助言をいただいた化学技術

Table 5 Analytical results

Sample No.	Ru, ppb	GBM protein, ppm	Ru ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ GBM protein)
1	$3950 \pm 180$	$68.4 \pm 31.3$	57.7
2	$3380 \pm 210$	$60.5 \pm 2.2$	55.9
3	$3150 \pm 120$	$68.0 \pm 17.7$	46.3
4	$2450 \pm 90$	$40.3 \pm 2.0$	60.8
5	$2780 \pm 50$	$46.6 \pm 5.8$	59.7
Ru ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ GBM protein) Mean $\pm$ SD			$56.1 \pm 5.8$
RSD			10.3%

研究所の川瀬 晃氏, 札川紀子氏, 浜松ホトニクス社の赤井義朗氏に感謝いたします。

(1990 年 10 月, 日本分析化学会)  
第 39 年会において一部発表)

#### 文 献

- 1) J. H. Luft: *Anat. Rec.*, **171**, 369 (1971).
- 2) E. B. Sandell: "Colorimetric Determination of Metals", 3rd ed., p. 778~779 (1958), (Interscience Publishers, Inc., New York).
- 3) J. L. M de Boer, F. J. M. Maessen: "Spectrochim. Acta", **38B**, 739 (1983).
- 4) 赤羽勤子, 清水駿平, 村上悠紀雄, 長 連英: 日本分析化学会第 37 年会講演要旨集, p. 1219 (1988).
- 5) 磯山博文, 内田哲男, 小口京子, 飯田忠三, 中川元吉: 第 51 回分析化学討論会講演要旨集, p. 521 (1990).
- 6) O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. I. Farr, R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).



**Determination of ruthenium in biological tissue by graphite furnace AAS after decomposition of the sample by tetramethylammonium hydroxide.** Hisae TAMURA<sup>\*1</sup>, Takami ARAI<sup>\*2</sup>, Mitsumasa NAGASE<sup>\*3</sup> and Norio ICHINOSE<sup>\*4</sup> (<sup>\*1</sup>Shizuoka Industrial Research Institute of Shizuoka Prefecture, 550, Makigaya, Shizuoka-shi, Shizuoka 421-12; <sup>\*2</sup>First Department of Medicine and <sup>\*4</sup>Department of Chemistry, Hamamatsu University School of Medicine, 3600, Handa-cho, Hamamatsu-shi, Shizuoka 431-31; <sup>\*3</sup>First Department of Medicine, Teikyo University School of Medicine, 2-11-1, Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173)

An analytical method has been established for the determination of ruthenium in glomerular basement membrane (GBM) by graphite furnace AAS. The tissue was decomposed by 25% tetramethylammonium hydroxide. By ashing the solution (10  $\mu\text{l}$ ) at 1200°C for 30 s followed by atomizing at 2500°C for 5 s by using argon as a purge gas, atomic absorption of ruthenium was measured at 349.9 nm. The effect of diverse elements was suppressed by the use of peak area measurement and the optimum ashing temperature. The relative standard deviation of the proposed method was 10.3% at  $56.1 \pm 5.8$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  GBM protein. The limit of detection was 5.5 ppb.

(Received September 11, 1991)

***Keyword phrases***

ruthenium in glomerular basement membrane; determination of ruthenium; graphite furnace AAS; tetramethylammonium hydroxide.

---