

原子吸光分光測定法によるNi、Co両元素の同時微量 定量分析

木下, 洋夫
九州大学医療技術短期大学部診療放射線技術学科

森口, 政嗣
九州大学医学部脳神経外科

<https://doi.org/10.15017/200>

出版情報：九州大学医療技術短期大学部紀要. 17, pp.13-16, 1990-03-05. 九州大学医療技術短期大学部
バージョン：
権利関係：

原子吸光分光測定法による Ni、Co 両元素の 同時微量定量分析

木下 洋夫* 森口 政嗣**

Simultaneous Microquantitative Analysis of Both Ni and Co Elements
by Atomic Absorption Spectrophotometry

Nadao Kinoshita and Masashi Moriguchi

緒 言

近年、多くの疾病に対して薬効を高める目的で薬物をリポソーム、或いはリピッドマイクロスフェア、または高分子マイクロスフェア製剤とし、疾患部へのターゲティング療法に用いる試みが盛んに行われるようになった^{1), 2), 3)}。このように drug delivery system (以下 DDS と略す) を考えて造られた製剤の体内動態を追究することは封入薬物を病巣へどれだけ送達できるかを知る上で大変重要と云える。

この度、著者らはリポソーム製剤の体内動態を追究する新しい方法を探す目的で原子吸光分析法を用いた基礎的な実験を行った。即ち、Ni ならびに Co 元素は生体内含量は極めて少なく⁴⁾ 原子吸光分析の感度も優れているなど、体内でリポソームの追跡マーカーとなり得ると考え、原子吸光測定法による両元素の測定条件や利用の可能性を検討したので報告する。

実験材料と方法

薬品、エチレンジアミン四酢酸ニッケル錯塩 ($C_{10}H_{12}N_2O_8 Na_2Ni \cdot 2H_2O$ = 式量 428.92、以下 Ni-EDTA と略す) とエチレンジアミン四酢酸コバルト錯塩 ($C_{10}H_{12}N_2O_8 Na_2Co \cdot$

$4H_2O$ = 式量 465.19、以下 Co-EDTA と略す) はドータイト試薬を用い和光純薬工業から入手した。

Ni ならびに Co 溶液、a) 100mM Ni 標準溶液の調製。Ni-EDTA の 4.289 g を精確に量り、約 90ml の蒸留水で溶かした後、0.1N NaOH で pH 7.4 に調整し 100ml のメスフラスコに移して標線まで蒸留水を加えて作った。b) 100mM Co 標準溶液の調製。Co-EDTA 4.652 g を精確に量り、上記 Ni の場合と同様にして作った。c) 実験に必要ないろいろな濃度の Ni あるいは Co 溶液の調製。上記 100mM Ni-EDTA と 100mM Co-EDTA 溶液とから調製した。

機器、Ni ならびに Co 元素の原子吸光測定には日立多元素同時分析原子吸光分光光度計 Z-9000 形 (日立製作所、以下 Z-9000 形と略す) を用いた。

Ni ならびに Co 元素の測定、Table 1 の枠内は本分析操作の温度プログラムである。試料はすべて Z-9000 形に設置されているオートサンプラーによって希望の容量が採取されるが本実験ではすべて 20 μ l とした。試料 20 μ l はパイロ化キュベットに自動的に注入され、このあと DRY (乾燥)、ASH (灰化)、ATOM (原子化)、CLEAN (清掃) と設定条件に従ってマイクロコンピューター (以下 μ -CPU と

* 九州大学医療技術短期大学部一般教育

** 九州大学医学部脳神経外科

略す) により進められ、標準溶液から分析した未知試料まで自動的に測定が進行する。温度プログラムの設定は測定値の精度や再現性に変

重要で、Table 1 に示した温度条件は本実験に適したもので以後すべてこの温度プログラムで分析を行った。

Table 1 Ni と Co の分析に用いた温度プログラム

STANDARD SAMPLE		51	52	53	54	55	56	57	58	59
Ni	0.0	6.3	12.5	25.0	50.0					
Co	0.0	6.3	12.5	25.0	50.0					

INSTRUMENTAL CONDITION			
UNIT	:	PPB	
TIME CONSTANT	:	0.2 sec	
CUVETTE	:	PYRO	
CARRIER GAS	:	200ml/min	
INTERRUPTED GAS	:	30ml/min	

TEMPERATURE PROGRAM					GROUP1: Ni, Co
STAGE NO.	TEMPERATURE (C)	START	END	TIME (SEC)	
DRY	1	70	90	40	
DRY	2	90	120	30	
ASH	3	670	750	20	
ATOM	4	3000	3000	6	
CLEAN	5	3000	3000	3	

	W.L.	LAMP	DIMENSION
Ni	232.8nm	10.0mA	LINEAR
Co	248.7nm	15.0mA	LINEAR

結果

Fig. 1 は Ni ならびに Co のそれぞれを 50ppb, 25ppb, 12.5ppb, 6.25ppb 含む 4 種類の混合溶液を Z-9000 形を用いて分析、同機に組み込まれている μ -CPU より標準検量線として打ち

出したものである。縦軸は吸光度を横軸は溶液の濃度 (ppb) を目盛っており、この検量線を基にして未知試料の原子吸光度から μ -CPU が計算して Ni と Co の濃度が測られた。

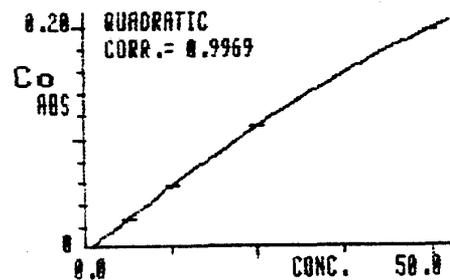
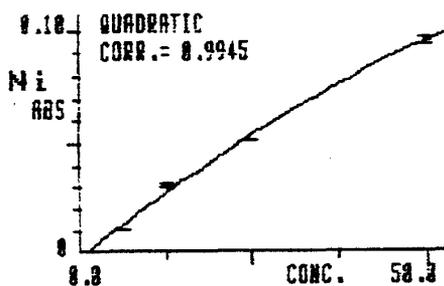


Fig. 1 Ni と Co の検量線

Table 2 の A は試料溶液として精確に Ni の 25ppb, 50ppb を含む溶液と Co の 25ppb, 50ppb を含む溶液を測定した結果を表わしている。測定は各々 2 回行われてその平均値と標準偏差が μ -CPU により計算され紙面に打ち出される。測定値は実際の濃度に対して $\pm 5\%$ 程度の誤差を生じた。Table 2 の B は両元素を同量含む混合溶液を用いて同時分別定量を試みた結果を示している。Co の 6.25ppb が 5.6 ± 0.2 ppb として測定され -10.4% の誤差が生じているが他は単独元素の測定のとおり 5% 前後の誤差で

終わっていることが分かる。Table 3 の A は今一度 Ni と Co の同じ濃度の混液の測定を検討した結果である。実際の濃度に対してほぼ $\pm 10\%$ の測定誤差で定量されている。Table 3 の B は Ni と Co の濃度に濃淡をつけて測定したもので、多量の Ni と少量の Co, 少量の Ni と多量の Co の定量性の可否を検討したものである。実際の濃度に対して $+2.4\%$ から -12% の測定誤差を生じている。以上の結果 Z-9000 形を用いた Ni と Co の同時微量分別定量は大体 $\pm 10\%$ の誤差で測定できることが分かった。

Table 2 Ni ならびに Co の単独ならびに混合溶液の定量結果

実験	試料濃度 (ppb) Ni / Co	測定値 (ppb) Ni / Co
A	25 / 0	26.4±1.1 / ND ⁺
	50 / 0	48.6±2.2 / ND
	0 / 25	ND / 24.0±0.4
	0 / 50	ND / 47.4±0.8
B	6.25 / 6.25	6.1 ⁺⁺ / 5.6±0.2
	12.5 / 12.5	12.7±0.1 / 11.8±0.3
	25.0 / 25.0	26.7±0.1 / 25.3±0.2

⁺不検出 ⁺⁺1回の測定

考 察

最近、DDS の研究が進み薬物を特殊な剤形にして薬効を高めようとする試みが盛んになってきた。なかでもリポソーム製剤はその方面で重要な分野を占めている。⁶⁾したがってリポソームの体内動態を究明する方法を確立することは大変価値のあることと云える。その際、当然のことながら感度の高い測定法が要求されるがリポソームのマーカースとして放射性同位元素を用いることは極めて有効な手段と云える。しかし、特殊な施設と設備を要し、さらに取り扱い許可が必要で危険性を伴うなど不便さは避けられない。この他に測定感度の高い方法と云えば蛍光物質をリポソームのマーカースとして用いることが考えられるが、著者らの経験からすると血清中のリポソームすなわち蛍光物質は測定可能であったが、さらに追究したい肝、腎、脾、肺などの臓器への取り込み量については臓器中のいろいろな物質により妨害されて精確な蛍光測定はできなかった。そこでもし、同様に高感度で測定できる原子吸光分析法を用いてリポソーム製剤の体内動態を追究すれば総べての組織内濃度を知ることができる筈であると考え本実験を行った。

一般に動物は個体差が大きいため、かなりの数の実験を重ねないと推計学的に有意の差を認めることができない場合が多い。しかし今同一個

Table 3 Ni と Co の同じ濃度の混液と異なる濃度の混液の定量結果

実験	試料濃度 (ppb) Ni / Co	測定値 (ppb) Ni / Co
A	6.25 / 6.25	5.6±0.0 / 5.6±0.1
	12.5 / 12.5	14.4±0.4 / 12.5±0.1
	25.0 / 25.0	24.1±0.4 / 24.4±0.1
	50.0 / 50.0	50.6±0.2 / 49.4±0.4
B	25.0 / 6.25	24.3±0.8 / 6.4±0.1
	6.25 / 25.5	5.5±0.1 / 25.3±0.5

体内に同時に二種のリポソームを投与して、それらの体内動態の相違を比較することが可能であれば例え一匹の動物の実験結果からでも十分に両者の優劣を決定できる筈である。よりすぐれたリポソーム製剤をより早く発見したい場合この方法を用いると好都合である。そこでリポソーム内に封入する2種類のマーカースを探することを考えた。この実験に使用した Ni ならびに Co 元素は動物では極微量元素で体内動態を追跡する場合、すべての組織でback ground を無視できるため、微量の取り込みでもあらゆる組織で感度よく測定できると考えられる。本研究に使用した Ni と Co 元素は今後リポソームに封入することを考えて、どちらも水溶性で同様な構造形式を有している Ni-EDTA 錯塩と Co-EDTA 錯塩を材料にしたが、この様な好条件が得られるのも Ni と Co 元素の物理的性質ならびに化学的性質の類似性が高い故だと云える。^{4), 8), 9)}¹⁰⁾

動物に薬物を投与して組織内濃度を測定する場合、薬物の最終濃度が50ppb以下になることが多い。リポソーム製剤の場合も例外ではない。本実験においても Ni と Co の濃度をそれぞれ50ppb, 25ppb, 12.5ppb, 6.25ppbとして定量を試みた。Fig. 1、Table 2、Table 3はこの濃度範囲でほぼ±10%の誤差で定量が可能であることを示している。比較するリポソームの臓器間への取り

込み量の違いを100%または200%上げて初めて効力の上昇を期待し得ることを考えた場合、リポソームのマーカ―として Ni と Co の両元素による標式法は十分に利用できると云える。

日立 Z-9000形は今回著者らが要求している Ni と Co の同時微量分別定量を容易に遂行してくれた。本機は4元素同時分析ができるよう設計されており、さらに、さらに2元素追加して4種類の製剤の体内動態を同時に分析できる可能性も持っている。Fig. 1 に示した検量線のグラフは機械が標準溶液の原子吸光度を測定し、自動的にデータを μ -CPU で処理して、最小2乗法と高次関数(1~3次)の組み合わせを行い作成したもので、このうちもっとも適した quadratic (2次)を選んだグラフである。このあと試料の測定値はこのグラフの式で換算されて濃度(ppb)で示される。

Ni と Co 両元素について6.25ppbから50ppbの濃度範囲で同時分別定量が可能なが分かった。このあと臓器中の Ni と Co を測定するため臓器の灰化を行わなければならないがこれも硝酸と過酸化水素による湿式灰化法で成功している。本研究はリポソームの体内動態を追究するための二重標識として Ni と Co の原子吸光分析が使用できる可能性を証明し得た報告である。

要 約

リポソームの体内動態を追究する手段として原子吸光測定法を選び可能性を検討した。

即ち、リポソームを二重標識することと測定値の back ground をできるだけ低くすることを考え、動物では極微量元素である Ni と Co について原子吸光測定法による同時微量分別定量の可能性を検討した。その結果、両元素は6.25ppbから50ppbの範囲でほぼ±10%の誤差で定量できることが分かった、これはリポソームのマーカ―として十分利用できる範囲である。

謝 辞

本研究にあたり、あらかじめ予備実験をして頂いた日立計測エンジニアリング社の米谷明氏に深く感謝の意を表わします。また、日立元素同時分析原子吸光分光々度計 Z-9000形の使用方法の御教示と装置の使用許可を賜った九州大学医学部附属病院薬剤部の皆様に心から感謝致します。

文 献

- 1) 加藤百合子：リポソーム。水島裕，他編：ターゲッティング療法，45~53頁，医薬ジャーナル社，大阪，1985。
- 2) 横山和正：薬物のキャリアーとしてのリピッドマイクロスフェア。同上，54~62頁
- 3) 橋田 充：高分子マイクロスフェア。同上，63~72頁
- 4) 山県 登：微量元素—環境科学特論—，産業図書，東京，1977。
- 5) 鈴木正巳：原子吸光分析法（機器分析実技シリーズ），共立出版，東京，1984。
- 6) 瀬崎 仁編：ドラッグデリバリーシステム，南江堂，東京，1986。
- 7) 保田立二：医学領域への応用。野島庄七，他編：リポソーム，245~276頁，南江堂，東京，1988。
- 8) Smith, R. M. : Cobalt. Mertz, W. : Trace element in human and animal nutrition, vol.1, 148~150, Academic Press Inc., U.S.A., 1987
- 9) Nielsen, F. H. : Nickel . ibid., 245~248.
- 10) 近角聰信，他：最新元素知識 東京書籍，東京，1976。