

## 2,4,6-トリス(2-ピリジル)-1,3,5-トリアジンをを用いる微量鉄の

### シーケンシャルインジェクション分析

## Sequential Injection Analysis of Trace Iron Using

### 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine

北澤咲良<sup>†</sup>, 手嶋紀雄<sup>†</sup>, 酒井忠雄<sup>†</sup>

Sakura Kitazawa<sup>†</sup>, Norio TESHIMA<sup>†</sup> and Tadao SAKAI<sup>†</sup>

**Abstract** Flow injection analysis (FIA) was conceived by Ruzicka and Hansen on 1975 as the first generation of non-segmented flow chemical analysis. FIA is a promising technique for being rapid, reproducible, reducing reagent consumption and automated, compared with chemical analysis based on a manual procedure. Thereafter, sequential injection analysis (SIA) was introduced on 1990 as the second generation of FIA. SIA is a versatile technique based on programmable flow controlled by a computer, and its reagent consumption is less than that of FIA. In the presence of a suitable reducing agent, iron(II) reacts with 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) to form a purple iron(II)-TPTZ complex ( $\lambda_{\max} = 593 \text{ nm}$ ). This paper describes a SIA method for the determination of trace iron.

## 1. 緒 言

健康な成人中の鉄の総量は、約 4 g であり、その約 65%が赤血球中の血色素鉄（ヘモグロビン）であり、約 30%が貯蔵鉄（フェリチンとヘモジデリン）として肝や脾などの臓器内に存在する<sup>1)</sup>。この他、3~5%が筋細胞中のミオグロビン（ヘモグロビンと同様にヘムタンパクに属する）である。血清中の鉄は、トランスフェリンと結合したトランスフェリン結合鉄であるが、その鉄量は全体の約 0.1%に過ぎない。しかし、このトランスフェリンは、鉄の運搬体として造血に深く関与している。また、血清鉄濃度の値が低いと鉄欠乏性貧血が、高いとヘモクロマトーシス（全身の臓器に鉄が過剰に沈着する）の疑いがあるなど、血清鉄は様々な疾患と密接に関係している。

現在、血清鉄の定量は、2-ニトロソ-5-[*N*-*n*-プロピル-N-(3-スルホプロピル)アミノ]フェノール (Nitroso-

PSAP) を用いる比色分析によって行われている<sup>2)</sup>。総合病院などの施設には、この Nitroso-PSAP 法を始めとする種々の方法を導入した多項目・多検体自動分析計が導入されているが、高額で一般の病院には普及していない。

1975年に Ruzicka と Hansen ら<sup>3)</sup>は化学分析の自動化を達成するフローインジェクション分析 (FIA) 法を提唱した。内径 0.5 mm 程度のテフロン管内に、試薬溶液を一定流速で送液し、数十から数百  $\mu\text{L}$  の試料溶液を注入し、テフロン管内の流れの中で化学反応を進行させ、フローセル付きの検出器で FIA シグナルを検出するものである。著者のグループでは、この FIA 法により、血清中の銅と鉄<sup>4)</sup>、あるいは銅、鉄、亜鉛<sup>5)</sup>を同時定量する分析システムを構築し、各種疾患との関連性について検討した。

しかし、FIA 法は試薬溶液を連続的に送液するため、試料と未反応の試薬が廃棄される。バッチマニュアル法に比べれば、試薬消費量は少ないものの、更なる改善が求められていた中、Ruzicka と Marshall ら<sup>6)</sup>は、第二世代の FIA として、シーケンシャルインジェクション分

<sup>†</sup>愛知工業大学工学部応用化学科（豊田市）

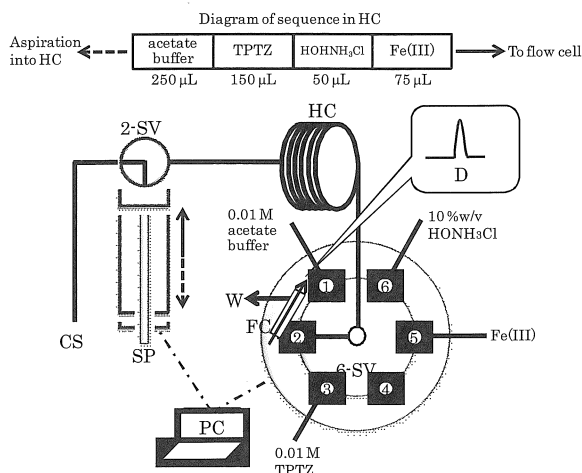


Fig. 1 Diagram of sequence in holding coil (HC) (upper) and SIA-LOV system for the determination of iron(III) (bottom). CS, carrier water; SP, syringe pump; 2-SV, 2-way selection valve; HC, holding coil; 6-SV, 6-way selection valve; FC, flow cell; D, spectrophotometer; W, waste.

析 (SIA) 法を開発した。この方法は、1 回の測定に必要な量 (数十から数百  $\mu\text{L}$ ) だけの試薬溶液と試料溶液とをテフロン細管内で混合させ検出するため、更なる省試薬化が進んだ<sup>7-9)</sup>。

そこで本研究では、SIA 法による血清鉄の分析法の確立を指向して、2,4,6-トリス(2-ピリジル)-1,3,5-トリアジン (TPTZ) を用いる微量鉄の SIA 吸光度法の実験諸条件を検討したので報告する。

## 2. 実験

### 2.1. 装置

バッチマニュアル法におけるスペクトルの測定には、日本分光製紫外・可視分光光度計 (V-550 型) を使用した。

SIA システムとして、FIALab Instruments 製 FIALab 3000 を用いた。このシステムの基本要素は、Fig. 1 に示すように、2.5 mL のシリンジポンプ (SP)、2 方セレクトバルブ (2-SV)、試薬と試料を吸引するホールディングコイル (HC)、6 方セレクトバルブ (6-SV) である。この 6-SV 上には、アクリル樹脂製のユニットが取り付けられている。このユニットには、流路とフローセルが精密加工技術により形成されており、化学反応を行う場ならびに検出する場がバルブ上に集約されている。これは、SIA-ラボ・オン・バルブ (SIA-LOV) と呼ばれ

Table 1 Operation sequence of the SIA-LOV system

Step	6-SV port position	Flow rate / $\mu\text{L min}^{-1}$ <sup>a</sup>	Description
1	1	20 (↓)	Aspiration of 250 $\mu\text{L}$ acetate buffer
2	3	20 (↓)	Aspiration of 150 $\mu\text{L}$ TPTZ
3	6	20 (↓)	Aspiration of 50 $\mu\text{L}$ HONH <sub>3</sub> Cl
4	5	20 (↓)	Aspiration of 75 $\mu\text{L}$ Fe(III)/Std.
5	2	50 (↑)	Transportation of reaction mixture to detector to monitor the absorbance at 595nm

a. (↓), direction of syringe pump motion for aspiration (forward flow); (↑), direction of syringe pump motion for transportation (reverse flow).

る<sup>10)</sup>分析システムである。6-SV 上のユニットには、光ファイバーケーブルが接続されており、タングステンハロゲンランプ光源 (Ocean Optics 製, USA, LS-1 型) からの光がフローセルを通過し、透過光が紫外可視分光光度計 (Ocean Optics 製, USA, USB 2000 型) に導かれ、吸光度が検出される。以上の SIA-LOV システムは、すべてコンピューターにインストールされている FIALab Instruments 製の制御プログラムにより自動的に制御される。

また、溶液の pH は堀場製作所製の pH メーター (F-22 型) を用いて測定した。

### 2.2. 試薬

試薬溶液の調製及び希釈に用いた水はすべて ADVANTEC 製の超純水製造装置 (GSH-210 型) により精製された超純水を用いた。

鉄(III)標準溶液: 原子吸光分析用の 1000 ppm 鉄標準溶液 (和光純薬製) を 0.01 M 硝酸で適宜希釈して用いた。

TPTZ 溶液 ( $5.0 \times 10^{-2}$  M): 2,4,6-トリス(2-ピリジル)-1,3,5-トリアジン (和光純薬工業製, MW = 312.33) 0.7808 g を 0.01 M 硫酸に溶解し、同濃度の硫酸で 50 mL に定容した。この原液を適宜希釈して用いた。

塩酸ヒドロキシルアミン溶液 (10 %w/v): 塩酸ヒドロキシルアミン (和光純薬工業製, HONH<sub>3</sub>Cl, FW =

69.49) 1.0 g を水で溶解し, 10 mL に定容した.

酢酸塩緩衝液: 酢酸水溶液と酢酸ナトリウム水溶液を適宜混合し, 目的の pH 緩衝液を得た.

りん酸塩緩衝液: りん酸二水素ナトリウム水溶液とりん酸水素二ナトリウム水溶液を適宜混合し, pH 6.0 の緩衝液を得, pH の影響を検討する実験で使用した.

### 2.3. 標準操作

SIA システムの動作を Table 1 に示す. Fig. 1 に示すように, 6-SV ポート 1 に 0.01 M の酢酸塩緩衝液 (pH 4.0), ポート 2 に検出器, ポート 3 に 0.01 M TPTZ 溶液, ポート 5 に鉄(III)標準溶液, ポート 6 に 10 %w/v 塩酸ヒドロキシルアミン溶液をセットし, シリンジポンプにより吸引・吐出の操作を行った.

最初に, シリンジポンプ上部の 2-SV をキャリアーの水を吸引する方向に切り替え, シリンジポンプ内に水を吸引する. 次に 2-SV を HC 側に切り替え, HC および検出器に繋がるポート 2 への流路内を洗浄する. 次に, 6-SV を逐次切り替えながら, シリンジポンプの下方向の動作により, 酢酸塩緩衝液, 塩酸ヒドロキシルアミン, TPTZ, Fe(III)標準溶液の順に HC 内へと吸引する. この際, HC 内では各試薬と標準溶液が混合される. シリンジポンプの上方向 (吸引時とは逆方向) の動作により, 反応溶液を検出器へと送液し, 吸収極大波長である 595 nm における吸光度を観測することにより, SIA ピークを得た.

## 3. 結果と考察

### 3.1. 吸収スペクトル

鉄(III)は適切な還元剤の共存により鉄(II)に還元され, この鉄(II)は, TPTZ と 1:2 組成の赤紫色のキレートを生成する<sup>11)</sup>. バッチマニュアル法により, このキレートの吸収スペクトルを以下の手順で測定した. 10 ppm の鉄(III)標準溶液 0, 2, 4, 6, 8, 10 mL をそれぞれ 50 mL メスフラスコにとり, 10 %w/v の塩酸ヒドロキシルアミン溶液 1 mL, 1 M の酢酸塩緩衝液 (pH 4.5) 5 mL,  $2.5 \times 10^{-2}$  M の TPTZ 溶液 5 mL を加えて, 水で 50 mL に定容した. よく振り混ぜたのち, 吸収スペクトルを測定した. 結果を Fig. 2 に示す. この結果より, 以下の SIA による検討では, 吸収極大波長である 595 nm における吸光度を測定することとした.

### 3.2. 各試薬と試料の HC 内への吸引順 (シーケンス) の影響

HC 内に試薬と試料を吸引する順序についての検討を行った. 試薬 3 種と試料の合計 4 つの溶液を吸引するので, その組み合わせは 24 通りとなる. これらすべての検討結果を Table 2 に示す. その結果, 2 ppm の鉄(III)を測定した際の吸光度と鉄(III)標準溶液の代わりに水を用いる試薬空試験値との差 (net) が, Table 2 内の (2) に示される”酢酸塩緩衝液, 塩酸ヒドロキシルアミン, TPTZ, 鉄(III)標準溶液”の順に吸引した場合に最大となった. 従って, 以降の検討では, Fig. 1 の上部に示されるシーケンスを選択した.

### 3.3. pH の影響

吸引する酢酸塩緩衝液の pH を 3.5~6.0 の範囲で変化させ, 2 ppm の鉄(III)を定量する際の吸光度への影響を調べた. pH 3.5~5.5 は酢酸塩緩衝液を, pH 6.0 はりん酸塩緩衝液を用いて調整した. 結果を Fig. 3 に示す. この結果より, net の値が最も高かった pH 4.0 を選択した.

### 3.4. TPTZ 濃度の影響

吸引する TPTZ 溶液の濃度を 0.001~0.02 M の範囲で変化させた. 結果を Fig. 4 に示す. net の値は, 0.01 M のときに最大となったので, TPTZ 濃度は, 0.01 M を選択した.

### 3.5. TPTZ 溶液の吸引体積の影響

吸引する TPTZ 溶液の体積を 50~200  $\mu$ L の範囲で変化させた. 結果を Fig. 5 に示す. この結果より, net の値が最も良好であった 150  $\mu$ L を選択した.

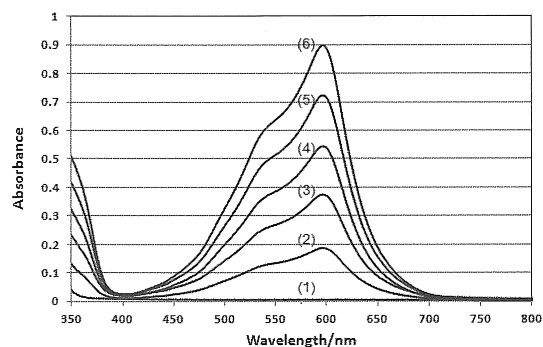


Fig. 2 Absorption spectra of iron(II)-TPTZ complexes.  $C_{\text{Fe(III)}}$  in ppm: (1), 0; (2), 0.4; (3), 0.8; (4), 1.2; (5), 1.6; (6), 2.0.  $C_{\text{TPTZ}}$ ,  $2.5 \times 10^{-3}$  M;  $C_{\text{Acetate Buffer}}$ , 0.1 M (pH 4.5),  $C_{\text{HONH}_2\text{Cl}}$ , 1 %w/v.

Table 2 Absorbance values of various sequence for SIA determination of iron(III)

Sequence of aspiration	2.0 ppm Fe(III)	blank	net
(1)Buffer-TPTZ-Std.-HONH <sub>3</sub> Cl	0.0157±0.000212	0.144±0.00646	0.128±0.00665
(2)Buffer-TPTZ-HONH <sub>3</sub> Cl-Std.	0.563±0.00610	0.0103±0.000372	0.552±0.00574
(3)Buffer-Std.-HONH <sub>3</sub> Cl-TPTZ	0.127±0.00108	0.0275±0.000396	0.0994±0.00095
(4)Buffer-Std.-TPTZ-HONH <sub>3</sub> Cl	0.0626±0.000429	0.0438±0.000709	0.0188±0.000285
(5)Buffer-HONH <sub>3</sub> Cl-TPTZ-Std.	0.0455±0.000485	0.0235±0.000495	0.0220±0.000505
(6)Buffer-HONH <sub>3</sub> Cl-Std.-TPTZ	0.186±0.00126	0.0220±0.000113	0.164±0.00135
(7)TPTZ-Std.-HONH <sub>3</sub> Cl-Buffer	0.0780±0.000173	0.00830±0.000626	0.0697±0.000492
(8)TPTZ-Std.-Buffer-HONH <sub>3</sub> Cl	0.0270±0.000418	0.0186±0.000153	0.00844±0.00844
(9)TPTZ-HONH <sub>3</sub> Cl-Buffer-Std.	0.0348±0.000722	0.0104±0.0000702	0.0244±0.000654
(10)TPTZ-HONH <sub>3</sub> Cl-Std.-Buffer	0.0828±0.000318	0.0359±0.000404	0.0469±0.000715
(11)TPTZ-Buffer-Std.-HONH <sub>3</sub> Cl	0.0838±0.00269	0.0265±0.000547	0.0573±0.00324
(12)TPTZ-Buffer-HONH <sub>3</sub> Cl-Std.	0.0624±0.001335	0.0128±0.000569	0.0496±0.00135
(13)Std.-HONH <sub>3</sub> Cl-Buffer-TPTZ	0.0446±0.00296	0.0296±0.000423	0.0150±0.00382
(14)Std.-HONH <sub>3</sub> Cl-TPTZ-Buffer	0.0772±0.000907	0.00608±0.000159	0.0712±0.00104
(15)Std.-Buffer-TPTZ-HONH <sub>3</sub> Cl	0.186±0.00448	0.0177±0.000257	0.169±0.00458
(16)Std.-Buffer-HONH <sub>3</sub> Cl-TPTZ	0.0464±0.000565	0.0298±0.000323	0.0165±0.000529
(17)Std-TPTZ-HONH <sub>3</sub> Cl-Buffer	0.0539±0.000821	0.0122±0.0000337	0.0418±0.000794
(18)Std.-TPTZ-Buffer-HONH <sub>3</sub> Cl	0.0415±0.000295	0.0125±0.00117	0.0290±0.00131
(19)HONH <sub>3</sub> Cl-Buffer-TPTZ-Std.	0.0836±0.00135	0.0341±0.000838	0.0495±0.000516
(20)HONH <sub>3</sub> Cl-Buffer-Std.-TPTZ	0.0692±0.000551	0.0323±0.00252	0.0369±0.00306
(21)HONH <sub>3</sub> Cl-TPTZ-Std.-Buffer	0.0605±0.000343	0.00552±0.000278	0.0550±0.000292
(22)HONH <sub>3</sub> Cl-TPTZ-Buffer-Std.	0.0758±0.000473	0.0199±0.000153	0.0503±0.000436
(23)HONH <sub>3</sub> Cl-Std.-Buffer-TPTZ	0.0663±0.00217	0.0113±0.000153	0.0550±0.000689
(24)HONH <sub>3</sub> Cl-Std.-TPTZ-Buffer	0.0740±0.000416	0.0100±0.000450	0.0640±0.000798

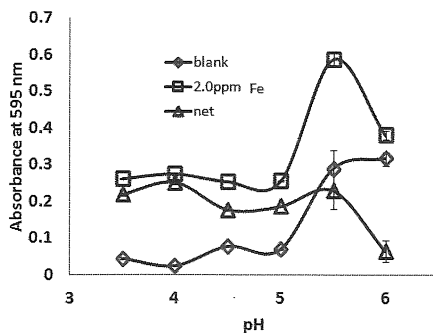


Fig. 3 Effect of pH on the absorbance.

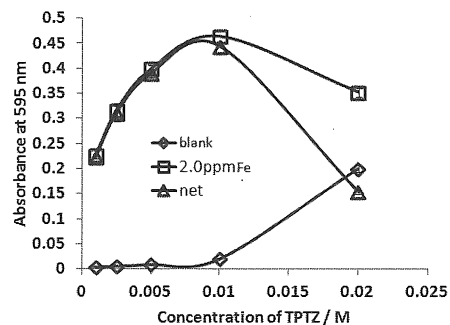


Fig. 4 Effect of TPTZ concentration.

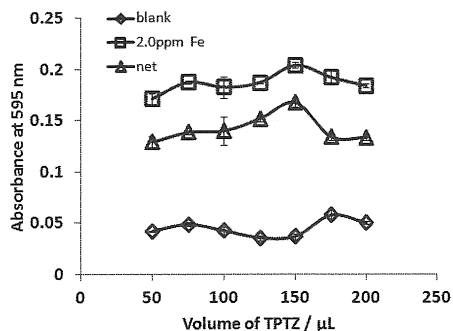


Fig. 5 Effect of aspiration volume of TPTZ solution.

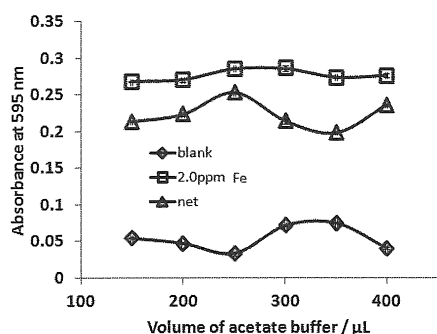


Fig. 6 Effect of aspiration volume of acetate buffer solution.

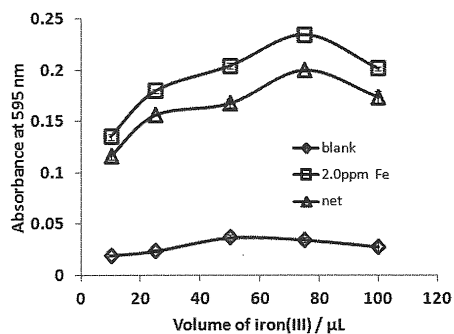


Fig. 7 Effect of aspiration volume of iron(III) standard solution.

### 3.6. 酢酸塩緩衝液の吸引体積の影響

吸引する酢酸塩緩衝液の体積を 150~400  $\mu\text{L}$  の範囲で変化させた。結果を Fig. 6 に示す。この結果より、250  $\mu\text{L}$  を選択した。

### 3.7. 鉄(III)標準溶液の吸引体積の影響

吸引する鉄(III)標準溶液の体積を 10~100  $\mu\text{L}$  の範囲で変化させた。結果を Fig. 7 に示す。吸引体積が 75  $\mu\text{L}$

を超えると、net 値が減少したので、鉄(III)標準溶液の吸引体積として 75  $\mu\text{L}$  を選択した。

### 3.8. 検量線

以上の最適条件下において、鉄(III)の濃度を変化させ SIA シグナルを得た。SIA シグナルの吸光度を鉄(III)濃度に対しプロットし、検量線を作成したところ、鉄(III)濃度が 0~2.0 ppm の範囲で、相関係数 0.999 と直線性の良好な結果が得られた。1 時間当たり 24 検体の測定が可能である。

## 4. 結 言

ここで提唱した SIA は、1 回の定量に必要な試薬と試料の数百  $\mu\text{L}$  を HC に吸引し、逆方向へ吐出する際に試薬と試料が混合され、検出器に導入される方法である。この操作は全て PC で制御されるため、FIA と違い全自動化されており、人為的誤差は極めて少ない。TPTZ の SIA への導入は初めてであり、独自のプロトコルを提案した。本法は、環境・生体試料への多検体分析に有用である。

## 文 献

- 1) 刈米重夫, 日本臨牀 ('85 年秋季増刊) 43 (1985) 532.
- 2) 松尾収二監修, 前川芳明編集, “改訂 3 版臨床検査デイクシヨナリー”, p. 111, (2004), (メディカ出版).
- 3) J. Ruzicka, E. H. Hansen, *Anal. Chim. Acta* 78 (1975) 145.
- 4) S. Gotoh, N. Teshima, T. Sakai, K. Ida, N. Ura: *Anal. Chim. Acta*, **499**, 91 (2003).
- 5) N. Teshima, S. Gotoh, K. Ida, T. Sakai: *Anal. Chim. Acta*, **557**, 387 (2006).
- 6) J. Ruzicka, G. D. Marshall, *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 329.
- 7) 酒井忠雄, 手嶋紀雄, *ぶんせき* 2001 (2001) 289.
- 8) T. Sakai, N. Teshima, *Anal. Sci.* 24 (2008) 855.
- 9) 手嶋紀雄, 酒井忠雄, *ぶんせき* 2010 (2010) 281.
- 10) J. Ruzicka, *Analyst* 125 (2000) 1053.
- 11) P. F. Collins, H. Diehl, G. F. Smith, *Anal. Chem* 31 (1959) 1862.