

ICP 発光分光分析法によるヒト尿中微量 アルミニウムの定量

田中俊行

Toshiyuki TANAKA

Determination of Trace Amounts of Aluminum in Human Urine by Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry

近年、臨床医学の分野では、透析痴呆¹⁾、Alzheimer病などの神経疾患とアルミニウム (Al) の強い関連性が注目されてきている²⁾。このような状況を背景として、生体組織、生体液中の微量 Al の定量法の確立および Al 含有量の正常値の確定が必要となってきた。

著者は、高感度元素分析法である ICP 発光分光分析法 (Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry) を用いてヒト血清、尿中の微量ケイ素の定量に関する研究を行ってきた^{3,4)}。今回は、この ICP 発光分光分析法を用いて、ng/ml レベルの Al を定量する場合の基礎的条件を検討し、ヒト尿試料の分析に応用したので、その結果を報告する。

材料と実験方法

1. 試料

健常者21人 (男10人, 女11人, 年齢18~21歳) の早朝尿をポリエチレン製容器に収集し、分析試料とした。なお、試料容器は密封して、分析まで-20°Cで凍結保存した。

2. 試薬

Al 標準溶液は、和光純薬工業社製原子吸光分析用 1000 µg/ml 標準液を適宜希釈したもの (0.1M塩酸性に調整) を用いた。その他の試薬類は市販の特級品をそのまま用い、水は Millipore 社製 Milli-RO/Milli-Q 水精製システムを通した脱イオン水を用いた。

Table 1 Operating conditions for inductively coupled plasma emission spectrometry

Frequency	27.12 MHz
Incident RF power	1.0 kW
Coolant argon flow-rate	16 l/min
Plasma argon flow-rate	1.0 l/min
Carrier argon flow-rate	0.55 l/min
Sample uptake rate	2.0 ml/min ^{a)}
Observation height	18 mm above load coil
Analytical wavelength	Al (I) 396.2 nm

^{a)}Sample : Two-fold diluted urine

なお、試薬溶液の保存には、ガラス製容器からのAlの汚染⁵⁾をさけるため、試料の保存と同様にポリエチレン製容器を用いた。

3. 装置および測定条件

ICP発光分析装置は、日本 Jarrell-Ash 社製 ICAP-500型を使用した。測定条件を Table 1 に示す。

4. 測定試料の調製および測定操作

尿試料は解凍後、その 5 ml に Al 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 標準液をマイクロピペット (Gilson 社製, Pipetman P-1000) で段階的に添加 (0 μl , 400 μl , 800 μl , 1200 μl) した系列を作成した。次いで、0.1M塩酸で全量を10mlとしたもの (Al 添加 2倍希釈尿) を測定試料とした。各測定試料は、ニューマティックネブライザー (クロスフロー型) で噴霧しながら、アルゴンプラズマに導入し、Table 1 の条件で分析線付近の波長走査を行い、396.2 nm での Al シグナルのピーク高さを測定した。

結果と考察

1. 測定条件の検討

分析線は、本実験で OH バンドの影響もなく、発光強度の大きかった 396.2 nm を選定した。次いで、2倍

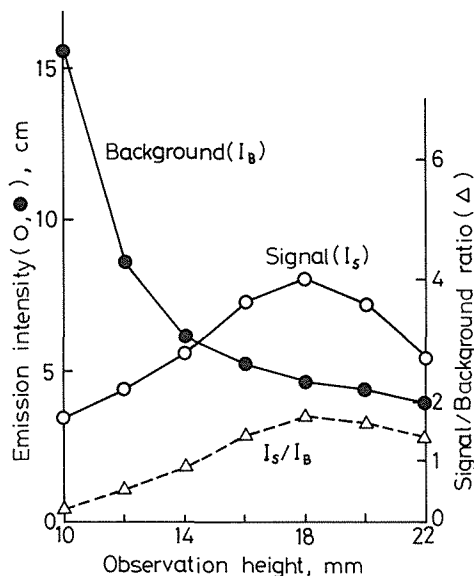


Fig. 1 Signal and background intensities and signal/background ratio obtained for the two-fold diluted urine (+ Al 0.1 $\mu\text{g/ml}$) as a function of observation height above load coil.

希釈尿 (+ Al 0.1 $\mu\text{g/ml}$) を対象として、Al のシグナル強度 (I_s) とバックグラウンド強度 (I_b) に及ぼす高周波出力、プラズマ内測光位置およびキャリアアルゴンガス流量の影響を検討した。測光位置の影響を検討した結果を Fig. 1 に示す。低い検出限界の測定を可能にするために、 I_s/I_b が最大となるコイル上 18 mm のプラズマ中心を測光位置とした。高周波出力は 0.8~2.0 kW の間で変化させて検討を行った結果、 I_s/I_b が出力の低下とともに増大して 0.8 kW で最大となった。しかしながら、0.8 kW では消火の可能性が高かったので、測定には高周波出力を 1.0 kW に設定した。キャリアアルゴンガス流量は 0.40~0.55 l/min の間で変化させて検討を行った結果、流量の増加とともに I_s/I_b が増大して、0.55 l/min で最大となった。

なお、Al 標準液を対象として行った高周波出力、測光位置、キャリアアルゴンガス流量の影響の検討でも、2倍希釈尿の場合と同様の結果が得られた。

2. 共存元素の影響

尿中に比較的多量に含まれるナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、リンの共存元素が、Al のシグナル強度とバックグラウンド強度に及ぼす影響を Table 1 の測定条件で検討した。その際、Al 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 標準液を基準溶液として用いた。得られた結果を Fig. 2 に示す。各元素の共存濃度は、その尿中含有濃度レベル (成人の尿中排泄量の正常値として、ナトリウムが 6.0~8.4 g/day, カリウムが 1.8~2.0 g/day, マグネシウムが 70~155 mg/day, カルシウムが 240~320 mg/day, 総リン酸が 1930~2260 mg/day であることが示されている⁶⁾) を充分にカバーする範囲に調整した。

検討した元素のうちで、カルシウムはバックグラウンド強度に著しい増大をもたらした。カルシウム 100 $\mu\text{g/ml}$ 共存濃度で、カルシウム無添加の場合に比べて約 3 倍、500 $\mu\text{g/ml}$ 共存濃度で約 16 倍のバックグラウンド強度であった。この原因としては、Al の分析線 (396.2 nm) に近いカルシウムのスペクトル線 (Ca II 396.8 nm と Ca II 393.4 nm) の強い発光による散乱のために生じたものと考えられる⁷⁾。そのほかの元素については、1000 $\mu\text{g/ml}$ 共存濃度までなんらバックグラウンド強度に影響を与えなかった。Al のシグナル強度に関しては、ナトリウム、カリウム、リンが 1000 $\mu\text{g/ml}$ 共存濃度で、無添加の場合に比べていずれも約 2.5 倍の明らかな増感効果を示した。これは、ナトリウム、カリウムのイオン化干渉⁸⁾の結果と推察される。リンでの増感効果は、リンを KH_2PO_4 として共存させており、カリウムの影響

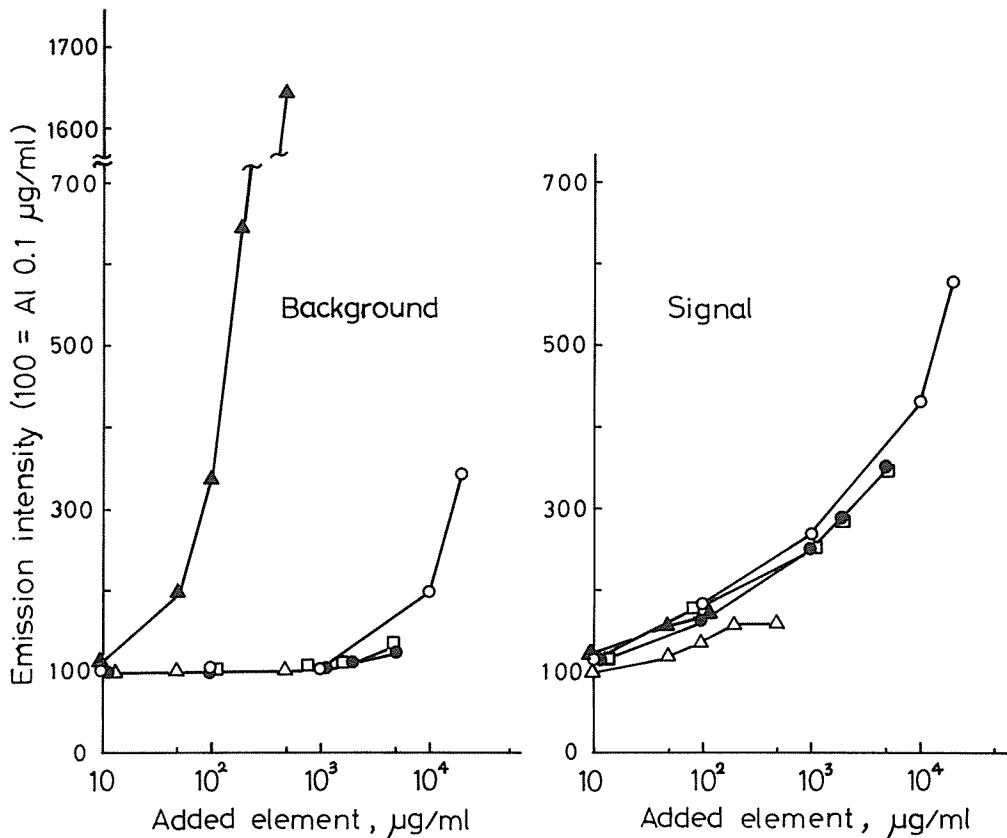


Fig. 2 Effects of coexisting elements on Al-signal and background intensities. Added elements : ○ Na (added as NaCl); ● K (added as KCl); △ Mg (added as MgSO₄); ▲ Ca (added as CaCl₂); □ P (added as KH₂PO₄).

が現われたものと考えられる。

3. 検量線と標準添加法

Al標準液を用いて、0～0.12 µg/mlまでの基準検量線を作成した。また、Al標準液を段階的に添加した2倍希釈尿について、標準添加検量線を作成した。その結果をFig.3に示す。Al標準液を用いた基準検量線の傾きに比べて標準添加検量線の傾きは2倍以上の値を示した。このことは、2倍希釈尿試料の基準検量線での定量が、著しい正誤差を与えるために不可能であることを示唆している。標準添加検量線の傾きが基準検量線に比べて大幅に増大している原因としては、前項で検討したように尿中に多量に共存するナトリウム、カリウムの影響が大きいものと考えられる。Fig. 4には、Al標準液、2倍希釈尿、Al添加2倍希釈尿につい

て、Alの分析線付近で波長走査を行ったチャートの1例を示す。2倍希釈尿にAl標準液(0.08 µg/ml)と同濃度のAlを添加した際、Alシグナル強度の増大が顕著なことがこの図から明らかである。また、バックグラウンド発光についても、Al標準液に比べて2倍希釈尿で大幅な増大を示している。この原因としては、前項で述べたように、尿中に共存するカルシウムの近接スペクトル線の影響が大きく寄与しているものと推察される。

4. 実試料の分析

本法により、2倍希釈尿に標準添加を行う方法を用いて、尿中のAlの定量を行った。早朝尿試料21例の分析結果をまとめてTable 2に示す。全試料について得られた尿中Al濃度は、6 ng/ml以下から72 ng/mlの

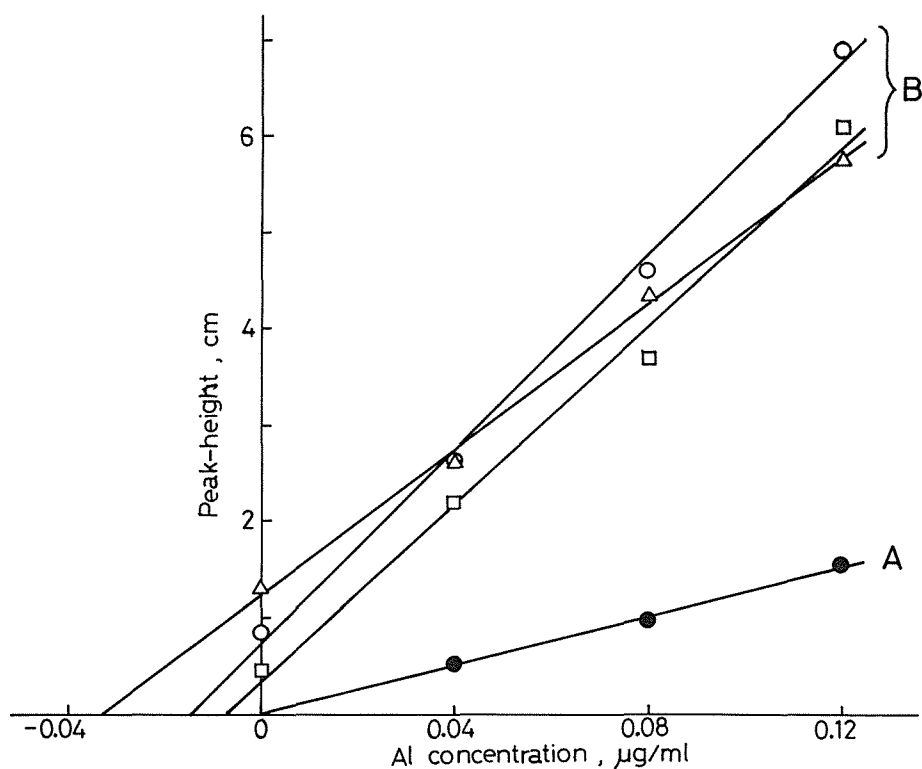


Fig. 3 Calibration curves for aluminum at 396.2 nm. (A) Aqueous solution; (B) With standard additions of aluminum to the two-fold diluted urine samples ($n=3$).

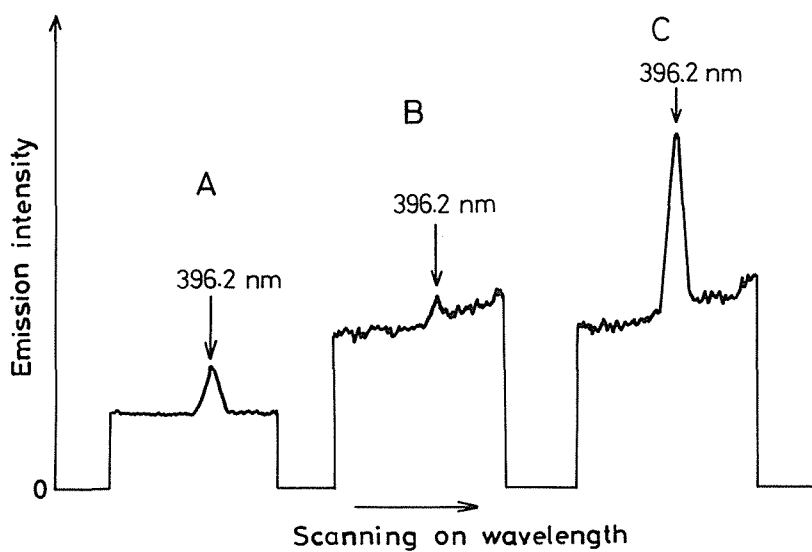


Fig. 4 Recorder tracings of Al-signal and background emissions. (A) Al 0.08 $\mu\text{g/ml}$; (B) Two-fold diluted urine; (C) Two-fold diluted urine + Al 0.08 $\mu\text{g/ml}$.

Table 2 Analytical results of aluminum in urine samples (n=21)

Sample	Al concn., ng/ml	Sample	Al concn., ng/ml
Male		Female	
Y. S	6	H. H	15
K. N	<6	H. O	30
T. O	<6	K. U	65
Y. N	8	T. S	72
H. M	16	K. R	38
S. W	30	N. A	44
T. K	9	T. G	35
H. Y	18	I. F	15
M. N	<6	M. O	32
T. S	12	H. M	<6
		Y. F	<6
Median	8.5		32

範囲の値を示し、その中央値は15 ng/mlであった。

現在のところ、ヒト尿中 Al 濃度に関する報告はほとんど見当たらない状況にある。その中で、Gorsky ら⁹⁾は、黒鉛炉原子吸光分析法で12人の健常男性の尿中 Al 排泄量を測定して、 $45 \pm 32 \mu\text{g/day}$ という値を得ている。1日平均尿量を $1.3 \text{ l}^{10)}$ と仮定すると、尿中 Al 濃度は $35 \pm 25 \text{ ng/ml}$ となる。また、Buratti ら¹¹⁾は、溶媒抽出を組合せた黒鉛炉原子吸光分析法で39人の健常男性の尿中 Al 濃度を測定して、 $7.0 \pm 2.0 \text{ ng/ml}$ の値を得ている。Allain ら¹²⁾は、ICP 発光分光分析法で14人の健常者の尿中 Al 濃度を測定して、 $4.7 \pm 2.5 \text{ ng/ml}$ の値を得ている。本法での今回の尿中 Al の分析結果は、Gorsky らの報告値と Buratti らの報告値の中間的な値であったと言える。

要 約

ICP 発光分光分析法による尿中の微量 Al の測定方法を確立し、2倍希釈尿を対象として標準添加法で実試料の定量を行った。健常者21名の早朝尿について得られた尿中 Al 濃度は、中央値が15 ng/ml であり、ヒト尿中 Al 濃度の正常値の確立に一資料を与えた。

本研究に際して、鳥取大学医療技術短期大学部衛生技術学科第八期生、太田垣浩子、長谷川初枝嬢の熱心

な援助を受けた。ここに深く感謝の意を表する。

文 献

- 1) Alfey, A. C., LeGendre, G. R. and Kaehny, W. D., N. Engl. J. Med., **294**, 184~188, 1976.
- 2) 和田攻：金属とヒト-エコトキシコロジーと臨床一, pp. 217~230, 朝倉書店, 東京, 1985.
- 3) 田中俊行, 医学と生物学, **112**, 111~114, 1986.
- 4) Tanaka, T. and Hayashi, Y., Clin. Chim. Acta, **156**, 109~113, 1986.
- 5) Leung, F. Y. and Henderson, A. R., Clin. Chem., **29**, 1966~1968, 1983.
- 6) 林康之, 植田伸夫, 木下忠俊：生化学データブック I, 日本生化学会編, p. 1601, 東京化学同人, 東京, 1979.
- 7) 古田直紀, 不破敬一郎：ICP 発光分析, 不破敬一郎, 原口紘彦編, p. 204, 化学の領域 増刊127号, 南江堂, 東京, 1980.
- 8) 河口広司：液体試料の発光分光分析, ICP を中心として, 高橋務, 村山精一編, p. 41, 学会出版センター, 東京, 1983.
- 9) Gorsky, J. E. and Dietz, A. A., Clin. Chem., **24**, 1485~1490, 1978.
- 10) 林康之, 植田伸夫, 木下忠俊：生化学データブック

- ク I, 日本生化学会編, p. 1597, 東京化学同人, 1984.
東京, 1979.
- 11) Buratti, M., Caravelli, G., Calzaferri, G. and Colombi, A., Clin. Chim. Acta, **141**, 253~259, 1984.
- 12) Allain, P. and Mauras, Y., Anal. Chem., **51**, 2089~2091, 1979.

Summary

Inductively coupled plasma emission spectrometric determination of aluminum in urine was investigated.

The established instrument-operating conditions were as follows : incident RF power (1.0 kW) ; coolant argon flow-rate (16 l/min) ; plasma argon flow-rate (1.0 l/min) ; carrier argon flow-rate (0.55 l/min) ; and observation height (18 mm above load coil). On the effects of coexisting elements, the Al-signal emission at 396.2 nm was enlarged by sodium and potassium. And the background emission at 396.2 nm was remarkably enlarged by calcium. Therefore, the standard addition method was employed for the determination of aluminum in two-fold diluted urine samples.

The proposed method was applied to 21 urine samples from healthy volunteers (age, 18-21). As the results, the observed aluminum values ranged from <6 to 72 ng/ml, with a median value of 15 ng/ml.

(受付 1986. 7. 23)