

試験管内 $\text{HbO}_2\text{-KCN-H}_2\text{O}_2$ 反応系における 鉄分離に関する研究

第 1 編

KCN 存在下に於ける O-Phenanthroline による 鉄定量法に関する検討

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂 教授)
指導: 九州大学 山岡教授)

藤 原 拓 一

[昭和 34 年 9 月 5 日受稿]

緒 言

鉄の定量法には Rhodankalium, 塩酸 Pyramidon, Ferrocyankalium, Sulfosalicylic acid, Isonitrosoacetophenon, $\alpha\text{-}\alpha'$ -Dipyridyl, 7-Jodo-8-oxygumelin-5-Sulfonic acid, O-Phenanthroline 等が用いられ, 教室島村¹⁾は Mc. Farlane によつて始められた最も普遍的な Rhodan-kali 定量法に従つた。本法は微量の鉄の存在にも鋭敏に発色する有利な点はあるが, その最も難点とされる所は褪色で, Shinohara²⁾はその褪色の最も重要な要素を出来た Rhodan 色素 $\text{Fe}(\text{CNS})_3$ の加水分解によるものとした, 更に Rhodan 法に伴う Amyl-alkohol, Aethor 及び醋酸 Ethyl による抽出並びに振盪操作は, 或程度の不正確さの原因を来すことを免れ得ない。

教室龍治³⁾は $\alpha\text{-}\alpha'$ -dipyridyl 定量法に従い易分離鉄の測定を行つたが, 本定量法は 1888 年 F. Blau⁴⁾により発見され, その後 F. Feigl, P. Kurmholz & H. Hamburg⁵⁾ 及び教室龍治等により詳細に検討がなされ, 2 価鉄 ion と結合した $\alpha\text{-}\alpha'$ -dipyridyl 鉄は非常に安定した色素で, 1937 年 L. G. Saywell⁶⁾によつて発見された O-phenanthroline と同様に鉄定量に関してはその優秀性が提唱されている。然しながら O-phenanthroline に比べるとその吸光係数は約 3 割方低くやや感受性が下廻るものである。

処で G. H. Walden, L. P. Hammett & R. P. Chapman⁷⁾等は 2 価鉄と O-phenanthroline とが錯塩を形成し, これが分析的な方面に利用されうことを認め, 次で F. Blau は O-phenanthroline が鉄

と錯塩を形成する際には $\alpha\text{-}\alpha'$ -dipyridyl と同じ態度をとり, 2 価鉄 1 分子と 3 分子の O-phenanthroline と結合するとのべ, F. Feigl もこれを肯定した。この錯塩の紅橙色を比色的に鉄の微量定量に始めて応用したのは L. G. Saywell & B. B. Cunningham で, 更にこの反応は F. C. Hummel & H. H. Willard⁸⁾, W. B. Fortune & M. G. Mellon⁹⁾, A. Thiel, H. Heinrich & van E. Engel¹⁰⁾, 教室木戸¹¹⁾等によつて検討を加えられ, 1937 年 H. Heilmeyer, K. Plöttner¹²⁾によつて血清鉄の定量に応用された。

更に 1940 年 G. Barkan¹³⁾が血清鉄及び Pseudo-hemoglobin 鉄即ち易分離鉄の定量法にも利用している。

処で $\text{HbO}_2\text{-KCN-H}_2\text{O}_2$ 反応系に於ける鉄分離を検討する場合, 反応系に介入する KCN が O-phenanthroline の鉄錯塩形成に障害を与えることが知られており, 上代, 菊地等¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾はこの障害を防止する方法として種々な方法を採用しているが, そのままの方法を踏襲することを避け, 新しい見地から検討を加え, 本反応系の鉄分離を追求する方法を考案し, 満足すべき結果を得たので報告する。

実 験 方 法

実験器具の清浄法

器具は全部硝子器具を用い, 鉄や銅などの金属性器具は夾雑物が混入して O-phenanthroline 鉄の呈色を障害するのみならず, 血色素と KCN, H_2O_2 の共同酸化に大きく影響するため極力使用を避けた。

器具は何れも一般化学器具清浄法に従つて清浄し,

使用前には更に塩酸溶液中に1昼夜浸して鉄を除去し、更に1昼夜水道水でよく水洗後蒸留水で洗滌して、非金属製容器に入れて乾燥させた。

pipette は通常塩酸溶液中に浸して置き、使用時には水流ポンプによりよく水洗後、蒸留水を通して乾燥させ夾雑物特に鉄分の除去に留意した。又、同一実験では可及的に同一条件の下に洗滌した器具を用い、微量鉄定量上の誤差を少なからしめた。

試 薬

試薬には蒸溜により精製した1.2%塩酸、0.1% O-phenanthroline 溶液、20%三塩化醋酸、飽和醋酸曹達、硫酸 hydrazine, pH 4.7 の 1M 醋酸緩衝液、KCN 溶液、H₂O₂ 溶液、過塩素酸、paranitrophenol、28% ammonia 溶液及び除鉄した再蒸留水を使用した。

鉄定量法

G. Barkan の O-phenanthroline 法に倣った教室木戸の変法に従い定量した。即ち被検液 4.0 cc に飽和醋酸曹達 1.0cc, pH 4.7 の 1M Michaelis 醋酸緩衝液への 1%硫酸 hydrazine 溶液 1.0 cc を加えると、硫酸 hydrazine により第1鉄に還元された被検液中の鉄は O-phenanthroline と錯塩を形成し、橙紅色を呈する。この呈色液を 10 mm の液槽に入れ、Purfrich の光度計を用い濾光板 S₅₀を通して吸光係数を測定する。なお O-phenanthroline 液は調製後永らく保存すればやや褐色調を帯びることがあるので、褐色瓶に入れて暗所に保存し、調製後3ヶ月以上のものは使用しなかつた。

実 験 成 績

1. 木戸の方法による測定成績

Merk 製純度 99.85% の鉄線を鉄 100 mg を含有するように正確に秤量し、これを予め濃硝酸 10 cc と再蒸留水 40 cc を加えて煮沸させておいたものの中に入れ、完全に溶解させた後、1 l の Mescolben に移し、全量が 1 l になるまで再蒸留水を加えて希釈し、鉄濃度 10 mg% の溶液を加え、これを標準鉄溶液とした。

本鉄標準液を使用し、教室木戸の方法により KCN 存在下の鉄量を測定してみると第1表の如く、KCN の濃度を相当希釈してもなお O-phenanthroline と鉄との錯塩形成を阻害することを認め、この阻害は 1.2% の塩酸により KCN が HCN として除去されても、なお残存する CN⁻ion によるものと考えられる。

第1表 KCN による O-phenanthroline と鉄との錯塩形成阻害

KCN 濃 度	Fe の吸光係数	Fe + KCN の吸光係数
0.0 M	0.456	0.456
1.0 "	0.451	0.358
0.1 "	0.450	0.402
0.01 "	0.458	0.420
0.001 "	0.452	0.432

2. 新しい方法による鉄定量法

被検液 (1 mg% 標準鉄溶液) 4.0 cc に KCN 0.5cc H₂O₂ 0.5 cc を加えて、37°C の恒温槽に16時間放置し、更にこれに20%三塩化醋酸溶液 2.5 cc を加え、全被検液を東洋濾紙 No. 6 で濾過し、得た濾液 1.0 cc を正確に 2.0 cc の目盛を施した小試験管にとり、これに濃硝酸 2 滴と過塩素酸 4 滴を加えて充分酸化の行われるまで火焰上で加熱し、これを paranitrophenol を指示薬として28%の ammonia 水で中和し、再蒸留水で 2.0 cc に希釈する。このものを教室木戸の方法により、O-phenanthroline で呈色し、Purfrich の光度計で濾光板 S₅₀を用い、液槽 10 mm で吸光係数を決定し、 $A(\%) = 0.91 \times (E - E_0) \times D$ で計算した。但し A は求める被検液の鉄濃度、E は被検液吸光係数、E₀ は盲検液吸光係数、D は希釈倍数で、盲検液は標準鉄溶液の代りに再蒸留水を使用し、他の操作は同様にした。

本法を用い上記の標準鉄溶液について測定を行つてみると第2表の如く、KCN の介入に伴う測定誤

第2表 新しい方法による測定成績

KCN の濃度	Fe の吸光係数	Fe + KCN の吸光係数
0.0 M	0.260	0.260
1.0 "	0.258	0.255
0.1 "	0.261	0.255
0.01 "	0.254	0.260
0.001 "	0.262	0.256

差は殆んど認めなかつた。

3. O-phenanthroline 鉄錯塩形成に及ぼす各種緩衝液の影響

各種緩衝液による O-phenanthroline の鉄錯塩形成に及ぼす影響を M/15 磷酸塩緩衝液及び M/15 硼酸緩衝液を使用し検討してみると第3表の如き結果を得た。即ち磷酸塩緩衝液では反応60分後明らかに呈色を抑制され、硼酸緩衝液では却つて促進され

第3表 各種緩衝液の O-phenanthroline 鉄錯塩形成に及ぼす影響

放置時間(室温)	60分	24時間
緩衝液		
M/15 磷酸塩緩衝液	0.205	0.565
M/5 硼酸緩衝液	0.533	0.580
水	0.402	0.571

(数字は吸光係数)

るが、室温24時間放置後では硼酸緩衝液の場合と殆んど大差なく、いずれも正確な値を得ることができた。

4. CO 通気の o-phenanthroline 鉄錯塩形成に及ぼす影響

標準鉄溶液に CO ガスを通気して鉄錯塩形成の値を測定してみると第4表の如く通気による影響は殆んど認められなかった。

第4表 各種緩衝液の CO 通気による影響

緩衝液	前	10分	20分	30分
M/15 磷酸塩緩衝液	500	508	494	507
M/5 硼酸緩衝液	500	503	506	498
水	500	495	505	502

(数字は%)

鉄標準液を各緩衝剤で1:20に希釈、各2cc 分注、型の如く呈色、室温24時間放置。

5. 各種緩衝液の CO ガス通気による影響

標準鉄溶液を各種緩衝剤で1:20に希釈したもの各2.0 cc を小試験管に分注し、次で CO ガスを通気し、一定時間後教室木戸の方法で呈色し、室温24時間放置して測定した結果第4表の成績を得た。その結果は殆んど影響を認めなかった。CO ガス通気は蟻酸と濃硫酸とにより発生した CO を20% pyrogallol 溶液、20%過マンガン酸加里溶液、水を通過させたものを各々10分、20分及び30分間通気した。

6. CO 通気時間と鉄遊離阻止作用並びに酸素通気によるその復元性

0.5 g% の血色素溶液に CO ガスを通気して通気時間と鉄遊離阻止作用の関係を眺めてみると第5表の如くである。即ち CO 通気30分で通気前の易分離鉄は約55%まで減少し、更に長時間通気してもほぼ同じ値を示した。かかる状態になったものに酸素を毎分80気泡宛通気して鉄遊離作用の復元性をみると通気約60分で大体前値の67%まで復元するのが認め

第5表 CO 通気時間と鉄遊離阻止作用及び O₂ 通気によるその復元性

通気時間(分)	前	10分	20分	30分	45分	60分
通気ガス						
CO (毎分100~200気泡)	100	82	73	55	51	55
O ₂ (毎分80気泡)		58	62	65	63	67

(数字は前値に対する%)

註. O₂ 通気は CO 飽和後に行つた。

られた。

7. 窒素ガス通気による鉄遊離阻止作用及び酸素通気によるその復元性

0.5 g% の血色素溶液に市販の窒素ボンベから窒素ガスを20% pyrogallol 溶液3回、20%過マンガン酸加里溶液1回、水1回を通過させて通気し、得た還元 hemoglobin からの易分離鉄遊離の状況を眺めてみると第6表の如き結果を得た。この場合窒素

第6表 N₂ 通気時間と鉄遊離阻止作用及び O₂ 通気によるその復元性

通気時間(分)	前	15分	30分	45分	60分
通気ガス					
N ₂ (毎分数千気泡)	100	62	53	38	36
O ₂ (毎分80気泡)		105	112		

(数字は前値に対する%)

註. O₂ 通気は N₂ 飽和後に行つた。

ガスは口径5 mm の硝子管から毎分数千気泡宛通気した。通気約60分で通気前の大約1/3の値に減少するのが認められた。この状態の還元 hemoglobin 溶液へ酸素を口径5 mm の硝子管から毎分80気泡宛通気して易分離鉄遊離の復元性をみると第6表の如くで通気約15分で元の値に帰り、多少通気前の値を超過したが、これは攪拌による反応進行のためと考えられる。

総括並びに考按

G. Barkan の o-phenanthroline 法による鉄特に易分離鉄の定量法を KCN の存在下に行つて種々検討を加えた結果、濃硫酸と過塩素酸により3価の鉄と結合している CN⁻ion を分離して測定すると KCN の存在しない時の鉄量と殆んど誤差のない値を測定することが出来ることを確認した。上代教授等は苛性曹達を用いて中和しているが、苛性曹達はその中に鉄を多量含有するため測定誤差が大となり例用に耐え得ないので28% ammonia 水を使用した。

又、硫酸は特級品を使用すれば少量であるため、その含有鉄分は殆んど無視してよい程度であつた。

次に磷酸緩衝液を使用しての鉄定量のさい *o*-phenanthroline の呈色は室温24時間放置により完全に発色せしめ得ることを認めた。この成績は教室の中島¹⁷⁾が教室湯浅¹⁸⁾の成績を追試した結果と一致するものである。

次に G. Barkan は易分離鉄の鉄遊離状態を CO ガス下に於いて検討し、0.4% の塩酸により遊離する鉄は CO ガス下に於いて遊離しなくなることを認めているので、CO ガス下の易分離鉄測定を検討した。

前準備として各種緩衝液に CO ガスを通気して鉄定量に及ぼす CO の影響を検討してみると何ら影響はなかつた。又、鉄標準溶液に CO ガスを通気しても測定上認め得べき障害はなかつた。

次に血色素に CO ガスを通気して易分離鉄の遊離阻止作用を眺めてみると CO ガス通気約30分で通気前の約 $\frac{1}{2}$ に減少するのが認められた。このものに再び酸素を通気して易分離鉄の還元性をみると酸素通気約60分でほぼ67%の還元性をみとめた。

更に窒素ガスを血色素に通気した場合の易分離鉄遊離阻止作用をみると、通気約60分で70%の減少を来し、これに酸素を通気してその還元性をみると通気約10分で易分離鉄の値は完全に還元することが確認された。この成績は G. Barkan が血色素において検討した成績に一致する。

結 論

G. Barkan の提唱した $\text{HbO}_2\text{-KCN-H}_2\text{O}_2$ 反応系における鉄分離の検討を行う予備実験として、KCN 存在下の鉄量の測定及び CO ガス下の測定につき検討を加え、次の結論を得た。

1. KCN の存在下では遊離した鉄が CN と結合して測定より逃れるが、濃硫酸と過塩素酸を加え、火焰上で加熱する操作を加えることにより、この測定誤差を防ぐことが出来た。又、苛性曹達に代え ammonia を用い、試薬中の鉄含有による測定誤差を防ぎ得た。

2. 磷酸緩衝液を用いる反応液での *o*-phenanthroline による鉄測定には *o*-phenanthroline 反応後室温24時間放置が必要であつた。

3. 各種緩衝液中の鉄測定時 CO ガス通気を行つても測定に影響はない。

4. 血色素に CO ガスを30分通気して易分離鉄量を測定すると、通気前の約 $\frac{1}{2}$ に減じ、再び酸素を60分通気してもほぼ67%の還元性をみるのみである。一方窒素ガス通気60分で70%減少するが、酸素通気10分で完全に還元する。

文 献

- 1) 島村：医学研究，22巻，137，(昭27)
- 2) K. Shinohara：J. Biochem. 29，(1942)
- 3) 龍治：医学研究，23巻，2309，(昭28)
- 4) F. Blau：Monatschr. 19，647，(1899)
- 5) F. Feigel, P. Kurmholz, H. Hamburg：Z. Analyt. Chem. 86，1，(1931)
- 6) L. G. Saywell, B. D. Cuninghame：Industr. & Engin. Chem. Analyt. Ed. 9，67，(1937)
- 7) G. H. Walden, L. P. Hawmet & R. Chapman：J. Amer. Chem. Soc. 53，3908，(1930)
- 8) F. C. Hummel & H. H. Willard：Industr. & Engin. Chem. Analyt. Ed. 10，13，(1938)
- 9) W. B. Fortune & M. G. Mellon：Industr. & Engin. Chem. Analyt. Ed. 10，60，(1938)
- 10) A. Thiel, H. Heinrich. & H. Van. Engel：Ber. Chem. Ges. 71，756，(1938)
- 11) 木戸：医学研究，25巻，1253，(昭30)
- 12) L. Heilmeyer & K. Plöttner：Das Serum Eisen u. die Serumkrht. Jena. Gustav Fischer. (1931)
- 13) G. Barkan & B. S. Walker：J. Biol. Chem. 135，37，(1940)
- 14) K. Kaziro, G. Kikuchi, T. Ogawa & M. Yamada：J. Biochem. 40，205，(1953)
- 15) G. Kikuchi & M. Yamada：J. Biochem. 41，239，(1954)
- 16) G. Kikuchi, M. Makita & T. Saito：J. Biochem. 41，227，(1954)
- 17) 中島 未発表。
- 18) 湯浅：医学研究，24巻，1353，(昭29)。

Studies on the Isortion of Iron in the $\text{HbO}_2\text{-KCN-H}_2\text{O}_2$ Reaction System in Vitro

Part I. Studies on the Quantitative Method of by O-phenanthrolin in the Presence of KCN

By

Takuichi Fujiwara

The First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School
(Chief; Prof. K. Kosaka: Director: Prof. K. Yamaoka Kyushu University)

The quantitative method of iron in the presence of KCN or CO-gas, as the reserve experiment observing on the isolation of iron in the $\text{HbO}_2\text{-KCN-H}_2\text{O}_2$ reaction system put forward by G. Barkan, was investigated. And the results were as follows.

1. The isolated iron combined with CN and missed the measurement, but the error of measurement could be prevented by the heating process on the fire after the addition of concentrated sulphuric acid and perchloric acid. On the other hand, the measuring error caused by the contain of iron in reagent could be prevented by the use of ammonia instead of caustic soda.

2. It was necessary to stand in the room temperature for 24 hours after the o-phenanthrolin reaction for the measurement of iron by o-phenanthrolin in the reaction solution using phosphate buffer.

3. When the iron dosis in various buffer was measured, the aeration of (C) gas had no influence on the measurement.

4. Measuring the dosis of easy split iron by the aeration of (C) gas to hemoglobin for 30 minutes, it decreased about one half as compared with that before the aeration of CO gas and it showed only the reversion of 67% by the aeration of oxygen for 60 minutes. On the other hand, it showed the decrease of 70% by the aeration of nitrogen gas, but it completely reverted to the initial dosis by the aeration of oxygen for 10 minutes.
