

牛血清中銅および亜鉛の高速液体クロマトグラフィーによる 同時定量

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	熊田, 昇二
巻/号	50巻5号
掲載ページ	p. 262-267
発行年月	1997年5月

牛血清中銅および亜鉛の高速液体クロマトグラフィーによる同時定量

熊田昇二

日本全業工業(株)中央研究所 (〒963-01 郡山市安積町笹川字平ノ上1-1)

(1996年7月16日受付・1997年2月7日受理)

要 約

牛血清を湿式灰化した後、テトラキスカルボキシフェニルボルフィン (TCPP) でラベルし、ピクリン酸を内部標準として、液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて銅 (Cu) および亜鉛 (Zn) の同時定量を行った。Cu および Zn 測定値 ($n=10$) の変動係数はそれぞれ 0.6% および 1.4% で、両者の平均添加回収率 ($n=10$) は $100 \pm 5\%$ 内、検出限界は Cu $0.01 \mu\text{g/ml}$, Zn $0.03 \mu\text{g/ml}$ であった。両者とも比色法との相関係数 0.95 以上の相関が得られた。臨床的に異常のない乳用牛 44 頭の血清中 Cu および Zn 濃度を本法を用いて測定したところ、 $0.629 \sim 1.224 \mu\text{g/ml}$ および $0.276 \sim 1.334 \mu\text{g/ml}$ であった。

—キーワード：銅, 牛, 高速液体クロマトグラフィー, テトラキスカルボキシフェニルボルフィン, 亜鉛。

日獣会誌 50, 262~267 (1997)

家畜における Cu, Zn などの微量ミネラルについては、ストレスおよび疾病の抑制などに関与するとして、これまで種々の報告がなされている [2, 3, 12, 14, 17]。血清中の Cu および Zn の定量には、原子吸光法 [3, 12, 14, 17]、プラズマ誘導結合法 [2] および比色法 [10, 16] がおもに用いられている。いっぽう、HPLC 法はミネラル [6]、ビタミン [8] および薬物 [1] などの定量に多用されており、共存成分の影響を受けにくく、高い精度が得られ多検体処理に適している。最近では、ボルフィン金属錯体と HPLC とを用いた微量ミネラルの多成分同時定量法の開発が報告されている [4, 5, 13]。

汎用性の高い HPLC を用いて、血清中の Cu と Zn の同時定量が可能になれば、少量の試料で多検体処理が可能となる。そこで著者は先に報告 [7] した改良灰化法を用い、TCPP をラベル剤とし、HPLC 法による牛血清中の Cu および Zn の同時定量の検討を行った。

材料および方法

供試試料：当社飼養の乳用牛ホルスタイン種 3 頭および繁殖用雌牛黒毛和種 7 頭 (表 1) の血清ならびに市販の牛血清^{a)}を用いた。

機器および試薬：HPLC^{b)}を用いた。灰化器機は既報 [7] のものを用いた。灰化用試薬は 60% 硝酸と 60% 過塩素酸 (有害金属測定用) を 1:1 の割合で混合した。TCPP (分析用) 液は 0.1M 四ホウ酸ナトリウム (pH 測定用) 液を加えて 0.25mM とした。pH 調整液は四ホウ酸ナトリウムに 0.5M 水酸化ナトリウム (microse-

lect)^{c)} 液を加えて 0.1M とした。チモールブルー液 (TB) は 0.1M 四ホウ酸ナトリウム液を加えて 0.1% とした。内部標準液 (IS) はピクリン酸に 0.1M 四ホウ酸ナトリウム液を加えて 0.002% とした。

移動相は 0.5M 乳酸溶液：シクロヘキサン (HPLC 用) = 1000:850 (V/V) とした。特に記載のない試薬については特級品を用いた。ガラス器具は、一昼夜酸処理したものを用いた。

測定方法：試料 0.2ml を正確に共栓遠沈管に取り、灰化用試薬 0.5ml を加えて攪拌し、キャピラリーを装着してブロックヒーター中で除々に加熱し、 $185 \pm 5^\circ\text{C}$ で 1 時間加熱した。その後、キャピラリーを外して数分間放置

表 1 供試牛の概要

牛 No.	品 種	生年月日	産次	体重 (kg)	乳量 (kg/日)
1	乳用牛ホルスタイン種	H4. 6. 4	1	647	18.7
2	乳用牛ホルスタイン種	H5. 1.16	1	583	17.0
3	乳用牛ホルスタイン種	H5. 5.29	1	554	15.9
4	繁殖用雌牛黒毛和種	H3. 5.12	2	451	—
5	繁殖用雌牛黒毛和種	H3. 5.15	1	500	—
6	繁殖用雌牛黒毛和種	H1. 6.17	3	537	—
7	繁殖用雌牛黒毛和種	H1. 8.11	4	476	—
8	繁殖用雌牛黒毛和種	H1. 8.20	4	633	—
9	繁殖用雌牛黒毛和種	H1. 6.10	4	448	—
10	繁殖用雌牛黒毛和種	H4.10.26	1	420	—

^{a)} Irvine Scientific, U.S.A. ^{b)} L5025 (カラムオーブン), L4250 (検出器), L6200 (ポンプ), AS400 (オートサンプラー), D6100 (HPLC マネージャー), 日立, 東京. ^{c)} フルカ, 和光, 大阪.

し、ブロックヒーター中から取り出して放冷した。これにTB数滴を滴下し、pH調整液を加えて青色(pH約9.2)とした。この液にラベル剤0.2mlを加え、さらにISを1ml正確に加えて混合した後、沸騰水浴中で30分間加熱した。放冷後、流速1.0ml、オープン温度43°C、逆相カラム^{d)}および検出波長413nmの条件下のHPLCにこの液を20 μ l注入した。

標準溶液は1 mg/mlのCuおよびZn標準溶液(原子吸光用)を蒸留水で適宜希釈し、0, 0.1, 0.3および0.5 μ g/mlのCuとZnを含む溶液とした。この液1mlを正確に遠沈管に取り試料と同様に操作し、最小二乗法により検量線を作成した。

HPLCの分離条件の検討: 乳酸とアセトニトリルを移動相として、AR, HGおよびRSタイプの逆相カラム^{e)}を用いて全成分が分離するまでの時間を求めた。

加熱時間の検討: 市販の牛血清を用いて、ラベル剤とCuおよびZnとの反応を促進させるために、沸騰水浴中で0~60分間加熱して平衡時間を求めた。

精度の検討: 市販の牛血清を用いて同一検体における測定値の変動係数(n=10)を求めた。さらに錯体生成後、暗所にはほぼ24時間放置して再度測定し、放置前後の測定値と変動係数を比較した。添加回収率は当社飼養

牛10頭の血清を用いてCuとZnを、それぞれ0.1および0.2 μ gずつ添加して求めた。

共存イオンの影響: カルシウム(Ca), コバルト(Co), マグネシウム(Mg), マンガン(Mn), ニッケル(Ni)および鉄(Fe)をそれぞれ0, 1, 5, 10, 20, 30, 40および50ppm添加して試料中のCuおよびZnの回収率を求めた。

比色法との比較: 野外の凍結保存血清27検体を用い、Cuをバソクプロイン法^{f)}[15]で、Znを2-(5-ブロモ-2-ピリジルアゾ)-5-(N-プロピル-N-スルホプロピルアミノ)フェノールナトリウム法^{g)}[9]で定量してHPLC法との相関を求めた。

野外例: 平成5年11月に福島県中央部の1牧場において、臨床的に健康と思われる乳用牛ホルスタイン種44頭から採取し、凍結保存した血清(-20°C, 18カ月保存)を用いた。

結 果

HPLCの分離条件: pH調整液の水酸化ナトリウム濃度が0.5Mであることから乳酸濃度を0.5Mとして、アセトニトリルとの比を変化させた。全成分が分離するまでの時間は、HG>RA>ARカラムの順に小さくなり、0.5M乳酸:アセトニトリル=1000:850(V/V)のときの比率が最適であった。保持時間が最も小さかったARカラムを用いて、カラム温度を43°Cとしたときの各成分の保持時間は、ISが2.2分、TBが2.8分、Zn錯体

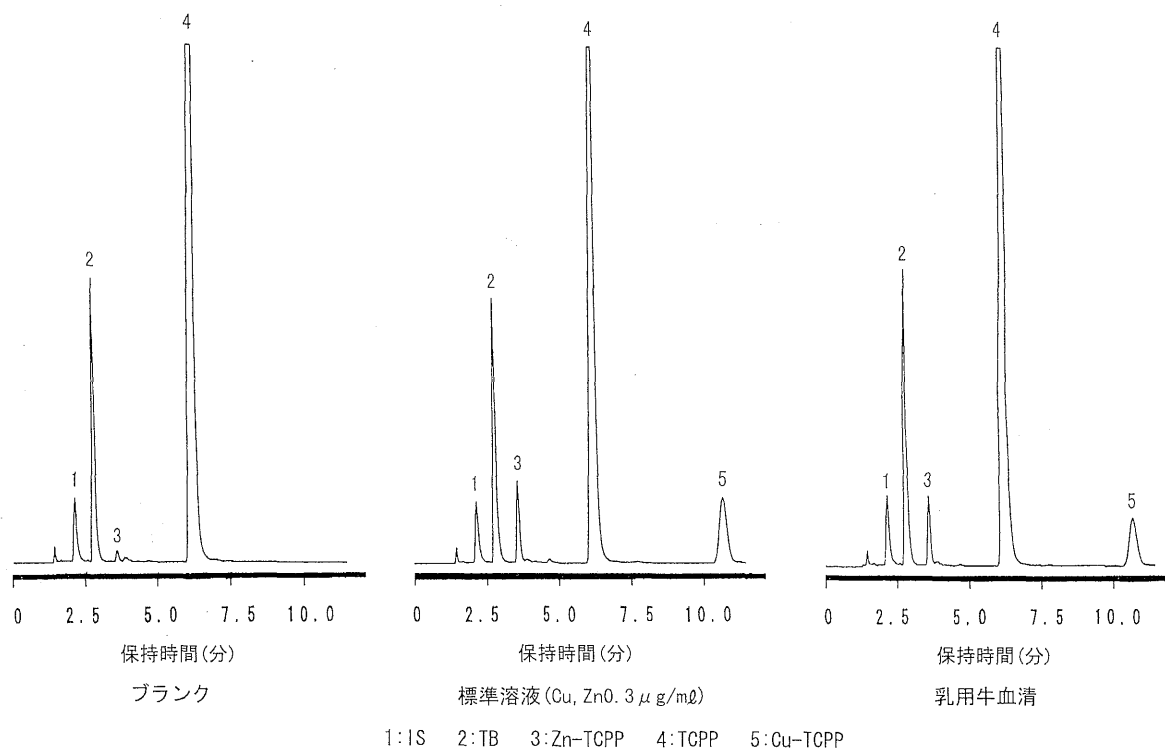


図1 ブランク、標準溶液および血清のクロマトグラム

d) 150mm (D)×4.6mm ϕ Wakosil-II 5C18AR, 和光, 大阪.

e) 150mm (D)×4.6mm ϕ Wakosil-II 5C18, 和光, 大阪.

f) シーユーテストワコー, 和光, 大阪.

g) Zn-テストワコー, 和光, 大阪.

(Zn-TCPP) が 3.6 分, TCPP が 6.2 分 および Cu 錯体 (Cu-TCPP) が 10.7 分であった. 図 1 にブランク, 標準溶液 (Cu 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Zn 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) および血清のクロマトグラムを示した. 検量線は直線性を示し, 相関係数は Cu および Zn とともに 0.99 であった. また Cu では 1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Zn では 1.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで直線性がみられた. 検出限界は Cu では 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Zn では 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった.

加熱時間の検討: 沸騰水浴中で 10 分間隔で 60 分まで加熱して得られた Cu, Zn-TCPP のピークの高さを内部標準のピークの高さで除した値の推移を図 2 に示した. 加熱 0 分では両者とも生成は認められなかったが, 10 分の加熱でこの反応は急速に促進された. その後両者の生成は, ほぼ平衡に達したが, 反応をより促進させるために加熱時間を 30 分とした.

精度の検討: 錯体生成後速やかに測定したときの平均値 (n=10) は, Cu が 1.129 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Zn が 1.090 $\mu\text{g}/\text{ml}$

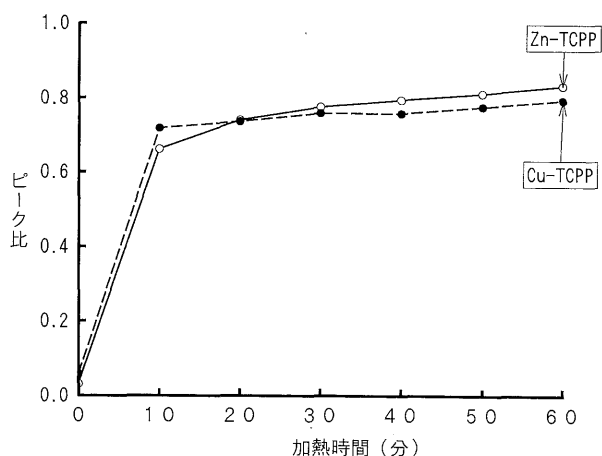


図 2 Cu, Zn-TCPP 生成に及ぼす加熱時間の影響

で, それぞれの変動係数は 0.6% および 1.4% であった. 暗所にはば 24 時間放置したものは, Cu が 1.112 および Zn が 1.100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 変動係数はそれぞれ 0.8% および 1.6% であった. 24 時間後の両者の測定値は Cu では 1.5% の減少, Zn では 0.9% の増加がみられ, 両者とも変動係数がわずかに大きくなった (表 2).

Cu と Zn を 0.1 μg ずつ添加した (n=10) 回収率 (平均) は, Cu で 96.0 ~ 109.0% (100.0%), Zn で 94.0 ~ 108.0% (98.9%) であった. 0.2 μg ずつ添加したものは, 同様に Cu で 97.0 ~ 102.0% (98.9%), Zn で 90.5 ~ 96.8% (96.8%) であり, いずれの平均値も 100 \pm 5% 内であった (表 3).

Cu 測定値に 5% 以上の影響を及ぼす共存イオンの最小濃度は, Ni, Fe で 5 ppm, Co, Mn では 10 ppm であり, いずれも負誤差がみられた. Ca および Mg は 50 ppm の共存でも測定値に影響を与えなかった (図 3).

表 2 Cu, Zn 測定値の変動係数 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

No.	I		II	
	Cu	Zn	Cu	Zn
1	1.129	1.090	1.118	1.101
2	1.130	1.096	1.125	1.106
3	1.122	1.094	1.122	1.109
4	1.129	1.092	1.119	1.095
5	1.127	1.117	1.116	1.123
6	1.144	1.083	1.133	1.081
7	1.135	1.093	1.127	1.114
8	1.128	1.081	1.122	1.096
9	1.127	1.097	1.119	1.112
10	1.116	1.055	1.098	1.062
平均値	1.129	1.090	1.112	1.100
変動係数(%)	0.6	1.4	0.8	1.6

I: 速やかに測定 II: 24 時間暗所放置後測定

表 3 Cu, Zn の添加回収率

牛 No.	Cu 添加量 (μg)					Zn 添加量 (μg)				
	0	0.1		0.2		0	0.1		0.2	
	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	回収量 (μg)	回収率 (%)	回収量 (μg)	回収率 (%)	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	回収量 (μg)	回収率 (%)	回収量 (μg)	回収率 (%)
1	0.780	0.101	101.0	0.194	97.0	0.815	0.094	94.0	0.202	101.0
2	0.790	0.109	109.0	0.194	97.0	1.025	0.096	96.0	0.197	98.5
3	0.685	0.099	99.0	0.198	99.0	0.765	0.108	108.0	0.184	92.0
4	0.590	0.102	102.0	0.195	97.5	1.035	0.095	95.0	0.181	90.5
5	0.620	0.100	100.0	0.204	102.0	0.815	0.106	106.0	0.204	102.0
6	0.665	0.098	98.0	0.198	99.0	0.840	0.101	101.0	0.194	97.0
7	0.570	0.100	100.0	0.198	99.0	0.930	0.095	95.0	0.192	96.0
8	0.500	0.097	97.0	0.200	100.0	1.060	0.095	95.0	0.190	95.0
9	0.685	0.096	96.0	0.199	99.5	0.875	0.101	101.0	0.198	99.0
10	0.630	0.099	99.0	0.197	98.5	0.735	0.098	98.0	0.193	96.5
最小値			96.0		97.0			94.0		90.5
最大値			109.0		102.0			108.0		102.0
平均値			100.0		98.9			98.9		96.8

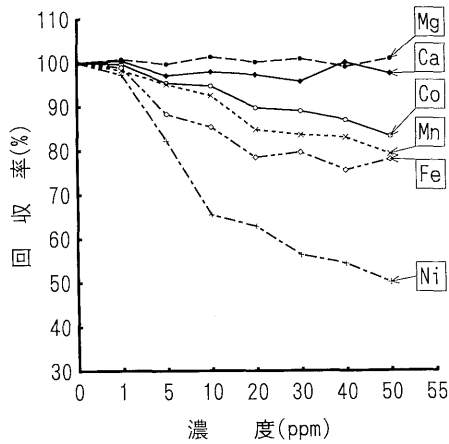


図3 Cu測定に対する共存イオンの影響

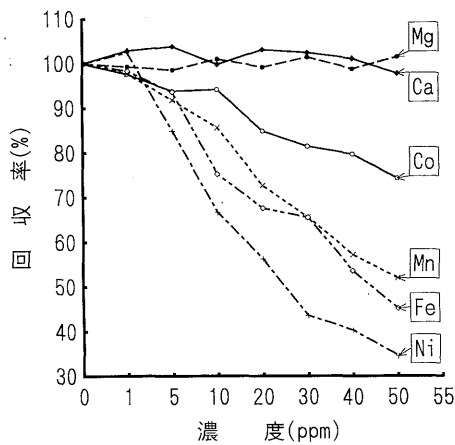


図4 Zn測定に対する共存イオンの影響

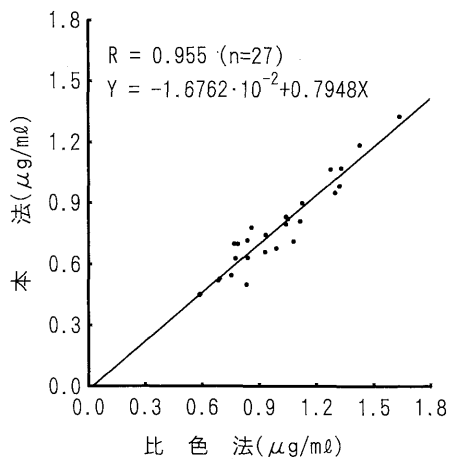


図5 本法と比色法によるCu濃度の相関

同様にZnにおいてもCaおよびMgは測定値に影響を及ぼさなかったが、Ni、Fe、CoおよびMnではいずれも5ppmの共存により負誤差がみられた(図4)。

比色法との比較：本法と比色法による測定値(n=27)の間の相関係数は、Cuで0.96($y = 0.7948x - 0.0017$), Znで0.98($y = 0.968x - 0.0035$)であった(図

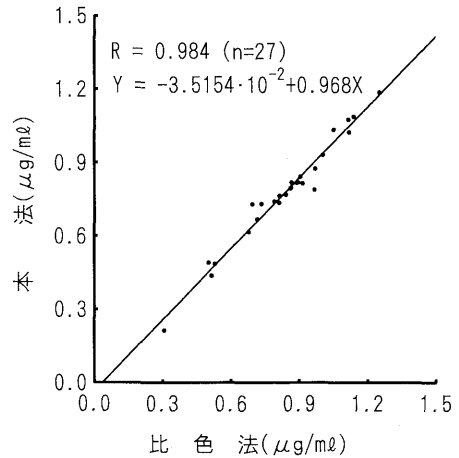


図6 本法と比色法によるZn濃度の相関

表4 野外における乳用牛ホルスタイン種のCu, Zn濃度(μg/ml)

牛No.	Cu	Zn	牛No.	Cu	Zn
1	0.895	0.276	21	0.768	0.990
2	0.895	0.927	22	0.971	1.051
3	0.823	1.178	23	1.218	0.964
4	0.808	0.604	24	1.027	0.971
5	0.902	0.605	25	0.901	1.027
6	0.827	0.857	26	0.703	1.207
7	0.902	0.739	27	0.707	0.704
8	0.854	0.991	28	1.142	0.923
9	0.846	0.878	29	1.224	0.809
10	1.026	1.063	30	0.931	1.108
11	1.020	0.821	31	0.945	0.960
12	0.866	1.041	32	0.742	0.740
13	0.855	0.456	33	0.777	1.334
14	0.734	1.232	34	0.785	0.872
15	0.629	0.982	35	1.181	0.975
16	0.879	0.687	36	0.696	1.038
17	0.638	0.718	37	1.081	1.254
18	0.856	1.251	38	0.929	0.736
19	1.000	0.875	39	0.834	0.942
20	0.903	1.017	40	0.854	1.076
			41	1.034	0.644
			42	0.693	0.994
			43	0.683	0.868
			44	0.662	1.015
最小値				0.629	0.276
最大値				1.224	1.334
平均値				0.878	0.918
標準偏差				0.149	0.213

5, 6)。

野外例：44頭の乳用牛における血清中CuおよびZn濃度の測定値は、0.629~1.224μg/ml(平均値±標準偏差, 0.878±0.149μg/ml)および0.276~1.334μg/ml(0.918±0.213μg/ml)であった。CuおよびZn濃度の最高値と平均値との間に大きな差はみられなかったが、Zn濃度はCu濃度よりも個体差が大きかった(表4)。

考 察

TCPP 錯体はアセトニトリルとカルボン酸の組み合わせにより溶出できる。しかし、カルボン酸には特有の刺激臭を有するものや、溶解性が低いものもあり取り扱いにくい。

今回著者は溶解のし易さおよび刺激臭がないことを条件にして乳酸を選択し、移動相の比と固定相を変化させて溶離条件を検討した。これにより、有機溶媒中に抽出する奥谷らの方法[13]と同様に約12分で全成分を分離、溶出することができた。ブランクにみられたZnのピークは、種々の試薬中に不純物としてZnが含まれていたためと考えられ、特にTB中に多く認められた。しかし、ブランクを含めすべての試料に同量ずつ含まれるので測定値に対する影響はない。

金属ポルフィリン錯体の生成反応には長時間を要するため還元剤あるいは水銀、鉛、カドミウムなどの重金属を触媒にして錯形成反応を促進している[4, 13]。また既報[7]では、湿式灰化終了後の試料液中に残存すると思われる硝酸の分解に還元剤を加えている。還元剤として新たに試薬を追加することは、コンタミネートによりブランク値を高くする恐れがあり、さらに重金属の添加により、環境汚染などの問題が派生する。そこで残留する硝酸については、灰化終了後にキャピラリーを外し数分間加熱してこれを揮散させ、触媒を用いる代わりに沸騰水浴中で加熱した。これにより24時間放置前後の測定誤差がCuおよびZnともに±1.5%であったことから、還元剤および触媒を添加する必要はないと考えられた。

また、TCPPはアルカリ土類金属とは反応しないため、CaおよびMgイオンが50ppm共存しても測定値に影響しない。しかし、Co, Fe, MnおよびNiの各遷移金属イオンが5ppm以上共存するとZn測定値は低値を示したので、溶血血清試料では負誤差を生じると考えられた。

CuおよびZnとラベル剤との錯体生成の最適pH範囲[4]の調整には、pH 9.2で青色となるTBを指示薬とし、0.1MのときのpHが9.3となる四ホウ酸ナトリウムと0.5M水酸化ナトリウム液とを混合液とすることにより、pHメーターを用いることなく容易に最適pH範囲内に調整することができた。これ以降、試料液を一定量とするために全量フラスコなどに移す、あるいは溶媒中に抽出するなど煩雑な操作が必要となる。前者の方法は試料液を希釈することになり、検出限界値を下回ることが考えられた。また、後者の方法では適切な溶媒を見いだせなかった。そこで検出限界値を下回ることなく、かつ操作が簡便な内部標準法を採用した。標準物質としてのピクリン酸は本法の溶出条件においてCu, Zn-TCPPよりも先に単一ピークとして分離され、目的物質の分離条件に影響しなかった。これにより、Cuおよび

Znの変動係数が1%台で、両者の添加回収率の平均値が100±5%と精度よく測定することができた。

比色法の測定値が本法よりも高値を示すことは、除蛋白操作により蛋白質が沈殿し、試料が濃縮したためと考えられる。また比色法では、個別に両者を測定するため、各0.5mlの試料が必要であるが、本法では0.2mlとわずかな量で両者を同時に分析することができた。また、検体数が27と少なかつたにもかかわらず、比色法と高い相関が得られており、本法の高い実用性が確認された。

牛の血中Cu濃度に関する正常範囲は、乳用牛0.5~1.5μg/ml、平均値0.9μg/ml(乳用牛, blood)[11]および32.8~35.2μg/ml(牛, 血清)[16]などの報告がある。今回測定した野外例の血清中Cu濃度の範囲は0.629~1.224μg/mlであり、前者の値とよく一致した。しかし、後者の値とは大きく異なっており、飼養管理あるいは測定法の違いによるものと考えられる。いっぽう、Zn濃度は肉用牛で80~120μg/dl(plasma)[10]と報告されている。今回のZn濃度の測定値0.276~1.334μg/mlは乳用牛の値であり、これらの値を直接比較することはできないが、全般に低値を示す傾向がみられた。この傾向は飼養形態の差や測定法の違いを反映したものとも考えられるが、Nocklesら[12]、Orrら[14]はストレスによって血中Zn濃度が低下すると報告しており、その可能性も示唆された。

以上のように本法は、牛血清中のCuおよびZn濃度を精度よく同時定量することができ、応用性の高い方法であることが確認された。

引用文献

- [1] 浅見成志, 新井芳典, 森田幸雄, 他: 日獣会誌, 47, 217-220 (1994)
- [2] Chirase NK, Hutchison DP, Thompson GB: J Anim Sci, 69, 4137-4145 (1991)
- [3] Erskine RJ, Bartlett PC: J Daily Sci, 76, 408-413 (1993)
- [4] 五十嵐淑朗, 小原 昭, 足立弘明, 他: 分析化学, 35, 829-831 (1986)
- [5] Kobayashi M, Saitoh K, Suzuki N: Chromatographia, 20, 72-74 (1985)
- [6] 熊田昇二, 本間惣太: 日獣会誌, 46, 108-111 (1993)
- [7] 熊田昇二, 本間惣太: 日獣会誌, 47, 827-830 (1994)
- [8] 牧村 進, 松尾修輔, 薄井萬平, 他: 日獣会誌, 44, 328-332 (1991)
- [9] Makino T, Saito M, Horiguchi D, et al: Clinica Chimica Acta, 120, 127-135 (1982)
- [10] National Research Council: Nutrient Requirements of Beef Cattle, 6th ed, 14-25, National Academy Press, Washington DC (1984)
- [11] National Research Council: Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 6th ed, 31-38, National Academy Press, Washington DC (1989)
- [12] Nockels CF, DeBonis J, Torrent J: J Anim Sci, 71,

- 2539-2545 (1993)
- [13] 奥谷忠雄, 笹倉巳鶴, 桜川昭雄, 他: 分析化学, 43, 751-755 (1994)
- [14] Orr CL, Hutcheson DP, Grainger RB, et al: J Anim Sci, 68, 2893-2900 (1990)
- [15] 柴田 進, 北村元仕: 現代診断検査法体系 日常臨床生化学定量法, 159-162 (1964)
- [16] 其田三夫監修: 主要症状を基礎にした牛の臨床, 改訂増補版, 751, デーリイマン社, 札幌 (1982)
- [17] Spears JW, Harvey RW, Brown TT Jr: J Am Vet Med Assoc, 199, 1731-1733 (1991)

Simultaneous Analysis of Copper and Zinc in Bovine Serum
by High Performance Liquid Chromatography

Shyoji KUMATA

Central Research Laboratories, Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd, 1-1 Sasagawa Asakamachi,
Koriyama 963-01, Japan

SUMMARY

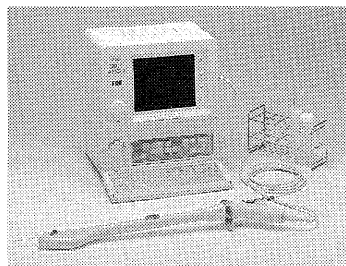
Bovine serum samples were labeled with tetrakis (4-carboxyphenyl) porphine after wet digestion, and copper and zinc were simultaneously quantified by high performance liquid chromatography using piclic acid as an internal standard. The variation coefficients of copper and zinc were 0.6% and 1.4%, respectively. The recovery rates of both metals were within $100 \pm 5\%$ and the detection limits of copper and zinc were $0.01 \mu\text{g/ml}$ and $0.03 \mu\text{g/ml}$, respectively. The correlation coefficient between the data and those with the conventional colorimetry was more than 0.95. Using this method, the serum copper and zinc levels of 44 apparently healthy Holstein cows were determined to be 0.629 to $1.224 \mu\text{g/ml}$ and 0.276 to $1.334 \mu\text{g/ml}$, respectively.

—Key words: cooper, cow, high performance liquid chromatography, tetrakis (4-carboxyphenyl) porphine, zinc.

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 50, 262~267 (1997)

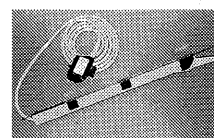
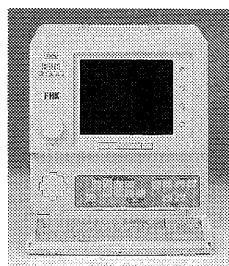
超音波卵胞卵子採取システム

C-1型 コンベックスタイプ



- スーパーアイ SSD-500
- コンベックス探触子 UST-994P-5
- 採卵針
- 吸引器 FV4
- 恒温槽 FV5

L-1型 リニアタイプ



- スーパーアイSSD-500
- リニア探触子
- 吸引器 FV4
- 恒温槽 FV5

FHK 富士平工業株式会社 東京都文京区本郷6丁目11番6号 〒113
電話 東京(03)3812-2271 ファクシミリ(03)3812-3663