

Helium-Glow Photometer による 1 nl 以下の 試料中の Na および K の定量分析

川崎医科大学 薬理学教室

渡 辺 悟, 村 山 好 道

(昭和 50 年 1 月 10 日 受付)

Determinations of Sodium and Potassium with Helium-Glow Photometer: Quantitative Analysis for a Volume Inferior to One Nanoliter

Satoru Watanabe and Yoshimichi Murayama

Department of Pharmacology, Kawasaki
University School of Medicine

(Accepted on Jan. 10, 1975)

1. Helium-glow photometer を用い 1 nl 以下の生体試料中の Na および K イオンを希釈操作せずに直接定量分析する測定法に関する基礎実験を行った。

2. ピペット容量 0.13 nl でもトランスファー自身による誤差は 3% 以内であった。Na 及び K 測定の再現性はそれぞれ 2.6% と 4.0% であった。感度は Na 1.2×10^{-12} mole, K 7.2×10^{-13} mole であった。Na の測定は K, Ca, Mg, P および尿素のそれぞれ 10, 5, 2, 10, 200 mM 以下の共存では影響されなかった。K の測定は Na によってのみ影響されたが, Na/K 比が 2 以上ではその抑制はほぼ一定 (45% 抑制) であった。

3. 希釈操作せずに 1 nl 以下の生体試料中の Na および K 濃度を容易に且つ直接測定する事が可能である。但し, K の測定は Na 濃度と Na/K 比に左右される。

1. The method to be described, by using helium-glow photometer, leads to the quantitative analysis of Na and K ions in biological fluid sample of a volume inferior to one nanoliter directly deposited on the tip of the iridium filament.

2. The pipetting error was within 3.0% even when 0.13 nl volume samples were directly transferred to the tip of the filament. The reproducibilities for Na and K determinations were 2.6% and 4.0% respectively. The sensitivities were 1.2×10^{-12} mole for Na and 7.2×10^{-13} mole for K. The Na measurement was not influenced by K (10 mM), Ca (5 mM), Mg (2 mM), P (10 mM) and Urea (200 mM). The K measurement was affected only by coexisting Na ion but the inhibitory effect was constant above a Na/K concentration ratio of 2 (45% inhibition).

3. It is possible to directly and easily determine Na and K concentrations in biological fluid sample of a picoliter order volume without diluting procedures. The determination of K concentration is however limited by the Na concentration and Na/K ratio.

はじめに

腎臓の生理学・薬理学の今日の発展は特に腎尿細管の微小穿刺法によると言っても過言ではなからう。この微小穿刺法で採取出来る尿細管尿の容量は5~10 nl (m μ l) 程度に過ぎない。一つの成分の定量に用いる量が微量であればある程、この限られた超微量の試量からより多種の成分(無機イオン, 有機化合物)の濃度を測定できるため、より多面的に腎機能を把握できるのは当然である。腎臓の生理・薬理学の研究にはNaおよびKの測定が不可欠であり微量化が進められている。Vurek and Bowman (1)はHelium-Glow Photometer (H. G. P.)を開発し、生体試料5 nlを10倍程度希釈した試料の5 nlでNaおよびKを測定している。ここでは希釈時に生ずる誤差を少なくする目的で生体試料の希釈操作を省略し、超微量ピペットで1 nl以下の試料をイリジウム金属線につけて行なう方法を試み、再現性、感度、直線性および他イオン・有機化合物(尿素)の影響について検討した。

I 方法の原理

一定量の液体試料をイリジウムフィラメントに付けヘリウム気体中で加熱、蒸発させると共に、オッシレーターと紫外線ランプでヘリウムをイオン化する。蒸発した金属原子はヘリウムからのエネルギー遷移により励起する。その後の原理は炎光光度計と全く同じで、励起された

電子が安定レベルにもどる際に発する金属特有の光放射を干渉フィルターを通して光電子倍增管に受ける。

II 方法

1. 微量定量用ピペット

内径0.5~0.9 mm, 長さ90 mmの毛細ガラス管(Scientific products製)の $\frac{1}{3}$ の所を小炎にて内径0.1 mm, 長さ40~50 mmになるように引き伸ばし、微小の毛細管を作製する。これを縦型ピュラー(成茂)で先端より僅かに上部に細い環状の白金線を、接触しないようにあてて徐々に加熱するとガラス管内部は狭窄する。再び、縦型ピュラーで細い方のガラス管の先端を円錐状にする。研磨器にかけ、ピペット先端の形状をととのえる(外径10 μ 程度)。このようにして狭窄形の超微量用ピペットが出来上がる。作製したピペットの容量は放射性アイソトープ液で計測した。ガラス管内外はジクロロジメチルシラン(東京化成)のクロロホルム溶液(7%)でシリコナイズした。イリジウムフィラメントへの試料のトランスファーは容量0.13~4.3 nlのピペットを用いた。トランスファー自体によるピペットの誤差はアイソトープ液を用いて計測(Pachard Tri Carb シンチレーション カウンター-3385)し、その結果を第一表に示した。同一容量のピペットを用い液体シンチレーター(INSTAGEL)の入った試料瓶5ケにトランスファーして測定した結果、標準偏差は1.6~3.3%でありピペット容量の大小には無関係であった。

Table 1. Surety of transfer using nl volume pipets

Pipet volume (nl)		4.3	1.5	0.53	0.24	0.13	
cpm (14 C)	Mean values	1195	424	151	69.8	37.1	
	Standard deviation	± 34	± 14	± 3.0	± 1.1	± 0.8	
Standard deviation (%)		2.2	1.6	2.0	3.3	2.9	2.4 \pm 0.69

Mean values of radioactivities of 5 replicates and the standard deviations were calculated for each pipet.

2. 測定条件

アミンコの H. G. P. (No. 4-8481) を用いた。Na 用 931-VA, K 用 1 P 28A の光電管 および 27.2 mHz のラジオ周波のオシレーターを用いた。イリジウム線の径は 0.05 mm, 長さ 20 mm であった。ヘリウムガスは 99.99% (Chemical pure grade, 製鉄化学) を用い, その流量は 200~250 ml/min とした。積算時間 0.1 sec, パージ時間 12 sec, 加熱時間 8 sec に設定した。

3. 測定試料

結果の各項に示した。

III 結果

1. 再現性

再現性は測定器自身による安定性とフィラメントへの試料のトランスファー操作およびフィラメント上の試料の付着部位により左右される。トランスファーピペット自身による誤差については既に述べた。

この実験では NaCl 150 mM と KCl 7.5 mM の溶液を用いた。4 回同一試料を連続的に測定し, 適当な時間間隔をおき同一操作を 6 回繰り返した。最長の時間間隔は 200 min とした。第 2 表にその結果を示した。各回 ($M_1 \sim M_6$) の 4 回の連続測定の標準偏差 (%) は Na の場合 1.4~2.5%, K の場合 1.6~4.6% であった。

各回の平均 (Mm) の標準偏差は Na の場合 2.6%, K の場合 4.0% であった。

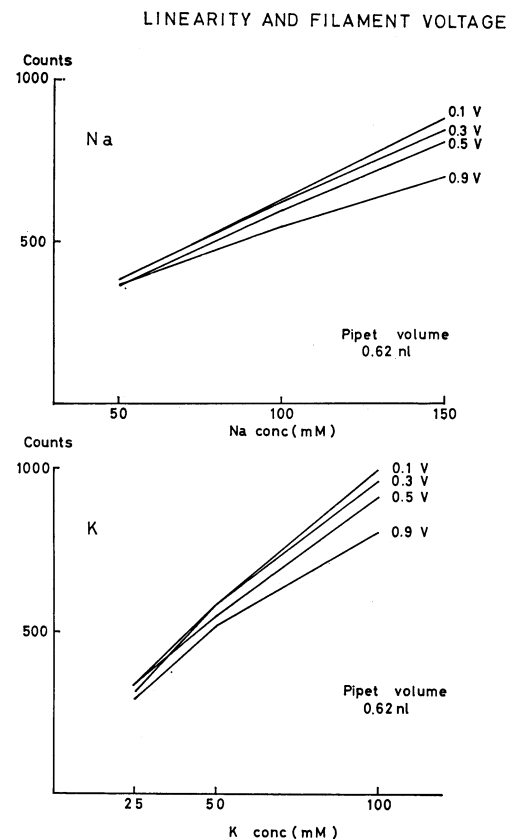


Fig. 1. Typical calibration curves for Na (upper) and K (lower), and change of filament voltage. Linearities were obtained at 0.3 volt or less.

Table 2. Reproducibility of Na and K determinations

Element	mM	Fil.V. (V)	P.M.	B.G.	m_1 ±S.D. (0 min)	m_2 ±S.D. (70 min)	m_3 ±S.D. (108 min)	m_4 ±S.D. (141 min)	m_5 ±S.D. (170 min)	m_6 ±S.D. (120 min)	Mm ±S.D. (S.D./Mm)
Na	150	0.3	5	10	524 ±9.6	488 ±9.4	513 ±12.8	495 ±6.2	501 ±11.0	509 ±9.9	505 ±13.0 (2.6%)
K	7.5	0.3	1	30	164 ±2.9	148 ±2.7	156 ±5.9	155 ±2.5	158 ±7.3	165 ±5.6	158 ±6.3 (4.0%)

Reproducibility has been studied on 4 deposits of each solution, variance of measurements obtained by deposit and by time duration.

Fil.V. = filament voltage, P.M. = photomultiplier scale, B.G. = back ground counts.

m_1 to m_6 = mean values of successive measurements of 4 replicates and its standard deviations (S.D). Mm = mean value of means m_1 to m_6 and the standard deviations.

Time course from first measurements (M_1) were indicated in parentheses.

Deposited volume was 0.62 nl.

2. 感度

Na および K 原子は他の金属原子に較べ蒸発しやすいため、フィラメントの加熱状態で直線性が左右される。容量 0.62 ml ピペットを用い、フィラメント電圧を変えて直線性的変化を調べた。結果を第 1 図に示した。

Na の場合 150 mM 以下、フィラメント電圧 0.1~0.5V の範囲ではほぼ直線性が得られたものの 0.9V 以上ではかなり傾斜がゆるやかになった。

K の場合 100 mM 以下でやはりフィラメント電圧を高めると直線性が失われてきた。

3. 他のイオンまたは有機化合物の影響

尿管尿中には Na または K イオン 以外に金属陽イオン (Ca⁺, Mg⁺, etc.), 陰イオン (HCO₃⁻, H₂PO₄⁻, HPO₄⁻ etc.) および非電解質 (尿素 etc.) が存在するので、Na および K の測定が如何に影響を受けるかをみる必要がある。

Table 3. Compositions of standard artificial solutions

Elements	Artificial solutions (mM)				
	200	150	100	50	25
NaCl	200	150	100	50	25
KCl	10	7.5	5.0	2.5	1.25
CaCl ₂	5	3.75	2.5	1.25	0.625
MgCl ₂	2	1.5	1.0	0.5	0.25
Urea	200	150	100	50	25

ここで用いた人工尿管液の組成を第 3 表に示した。

1) Na 測定

純粋の Na 標準液と人工液で比較した結果を第 4 表に示した。K, Ca, Mg, および尿素はそれぞれ 10, 5, 2, 200 mM 以下の濃度では Na の測定に影響しなかった。また別の実験で K を 200 mM としても Na に影響しなかった。

NaH₂PO₄ 5 mM および 10 mM を含む人工液で P の Na に対する影響と Na の回収誤差を検討した。その結果を第 5 表に示した。回収誤差の平均は P 5 mM の場合 2.4%, P 10 mM の場合 4.8% であった。

2) K 測定

純 K 標準液と人工液について K の検量線を比較すると、人工液の K が非常に抑制される事が観察された。この抑制は Ca, Mg および尿素によるものでなかったため Na の影響について更に検索した。第 2 図に示したように K 10 mM までの検量線をそれぞれ Na 200 mM, 50 mM, 25 mM の存在下で求めた。K の検量線はすべて直線性が認められたが、Na 50~200 mM の存在下での抑制は 51~57%, Na 25 mM の場合には 43% であった。この実験で K 濃度は 10 mM 以下で、Na/K 比は 2.5~80 の範囲であった。従って血清、近位尿管および遠位尿管起始部の K 濃度は容易に測定出来る。しかし、集合管または尿管尿では Na/K 比が

Table 4. Na calibrations of pure NaCl and artificial solutions

Concentration of Na (mM)	25	50	100	150	200
Pure NaCl solutions	44.3 ±1.9 *1	78.8 ±0.5	128.5 ±4.7	188.0 ±2.4	236.0 ±12.7
Artificial solutions *2	46.2 ±2.4	80.2 ±1.6	129.5 ±4.9	191.8 ±7.5	243.0 ±9.8
Artificial solutions not containing K ions	45.0 ±2.3	80.0 ±3.7	126.0 ±1.4	195.0 ±7.5	241.8 ±8.9

*1. Means and standard errors calculated.

*2. Compositions of artificial solutions were shown in Table
Volume of pipet used in the experiments was 0.4 ml.

P.M.=1, filament voltage= 0.3V

Table 5. Influences of Na H₂PO₄ on the determination of Na concentration in artificial solutions

NaCl in artificial solutions (mM)	NaH ₂ PO ₄ added (mM)	Total Na calculated (mM)	Na found (mM)	Differences (mM)	Recovery errors (%)
150	5	155	158.5	+3.5	2.3
150	10	160	169	+9.0	5.3
100	5	105	109	+4	3.8
100	10	110	114	+4	3.6
50	5	55	56	+1	1.8
50	10	60	61	+1	1.8
25	5	30	29.5	-0.5	1.7
25	10	35	32	-3.0	8.6
Mean values { 5mM, NaH ₂ PO ₄ 2.4% 10mM, " 4.8%					

Compositions of artificial solutions were shown in Table

Pipet volume = 0.62nl.

PM = 1, filament voltage = 0.3V

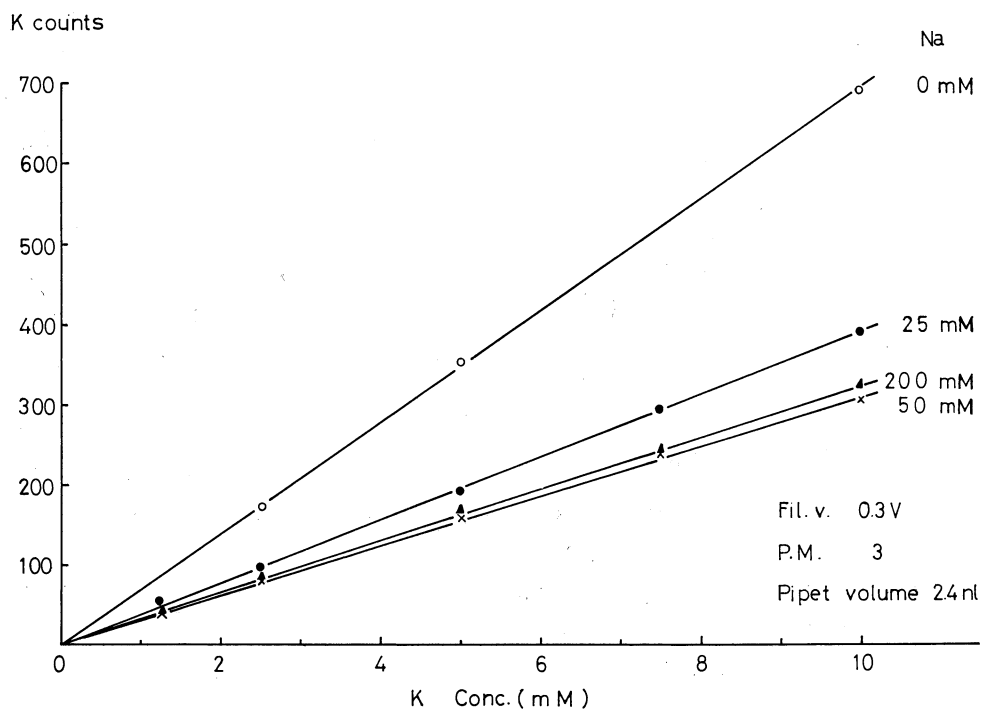


Fig. 2. Typical calibration curves for K in presence of Na 10, 25, 50 and 200 mM. Linearities were obtained under the selected concentrations.

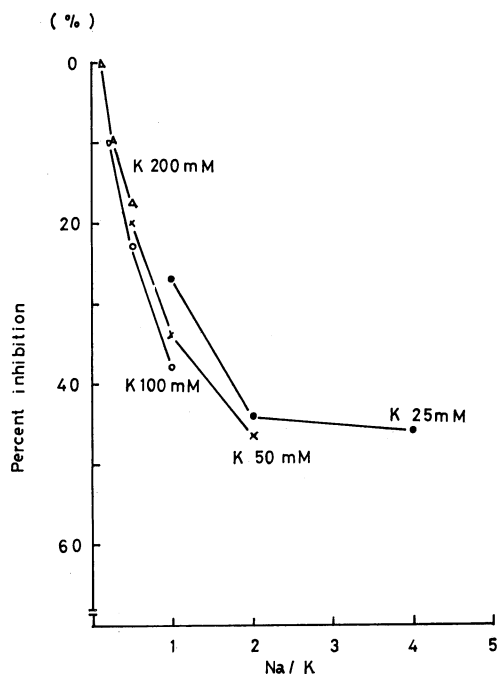


Fig. 3. Percent inhibition of potassium emission as function of Na/K ratio at high concentration of potassium. Percent inhibition of potassium was constantly maintained above 2 of Na/K ratio.

低下してくるので、Na/K比 2.5 以下について、即ち高 K 濃度溶液 (25~200 mM) を用いて K に対する抑制程度を検索した。第 3 図に示す如く K 25~200 mM の範囲では Na の混入の比率が大となるに従って、指数関数的に抑制が強まり Na/K 比 2 になって抑制はほぼ一定 (45%) となった。

IV 考 察

現在 1 ml 以下の液体試料中の Na および K イオンを定量出来る測定機器には H. G. P. 以外に Electron Probe Microanalyser (E. P. M.) が知られている (2, 3)。本測定の再現性は Na 2.6%, K 4.0% で E. P. M. による測定

の再現性 (Na 0.7%, K 1.7%) に較べると少々劣っている。測定感度は Counts/B. G.=1 の時 Na は 1.2×10^{-12} mole, K は 7.2×10^{-13} mole であった。E. P. M. では両者ともに 2.7×10^{-13} mole で $\frac{1}{3}$ ~ $\frac{1}{5}$ 程度劣っている。

Vurek and Bowman は血清ないし近位尿細管組成に近い濃度で、Na イオン測定に対する混在イオンまたは非電解質についての影響をみている。各種イオンおよび非電解質 (ほとんど尿素) の濃度は遠位尿細管さらに集合管を通過するにつれて変動する。ヘンレループを通過した尿は遠位尿細管起始部では Na 30~150 mM, K 5 mM, Ca 2 mM 以下, Mg 1 mM 以下, P 5 mM 以下 (3) および Urea 100 mM 以下 (4) となる。従って、最高濃度が尿素 200 mM, K 10 mM, Ca 5 mM および Mg 2 mM を用いて Na への影響を調べた。しかし、何ら影響はみられなかった。Na H₂PO₄ 添加により P の影響と Na の回収誤差を検索し、P が 5 mM で 2.4%, 10 mM で 4.8% の成績を得たが、Vurek and Bowman は P 1 mM で 3.1% であったと報告しているので P 10 mM 以上になると P の影響が出るのかも知れない。しかし、今までの成績を加味しても希釈操作をせず、超微量ピペットで液体試料を直接測定に供しても Na の濃度をほぼ正確に知ることが出来る。

K 測定に対する混在イオンまたは非金属分子の影響については Na 以外には認められなかった。遠位尿細管を過ぎ集合管に至る間では Na の再吸収と K の分泌により Na/K 比が低下し、1 またはそれ以下にもなり得ることはよく知られている。第 2, 3 図でよく分るように Na/K = 2 以上の場合ではほぼ一定の 45% の抑制が Na により起る。従って、実際の測定にあたっては Na/K = 2 以上の K の標準液で検量線を実験毎に求めれば問題はない。Na/K = 0.2~2 の範囲内では K 濃度の測定は難かしいであろう。

文 献

- 1) Vurek, G. G. and Bowman, R. L.: Helium-Glow Photometer for Picomole Analysis of Alkali Metals. *Science*, 149: 448—450, 1965.
- 2) Morel, F. and Roinel, N.: Application de la Microsonde Électronique a L'Analyse Élémentaires Quantitative d'Échantillons Liquides d'un Volume Inférieur a 10^{-9} L. *Journal de Chimie Physique*, 66: 1084—1091, 1969.
- 3) Murayama, Y., Morel, F. and Le Grimellec, C.: Phosphate, Calcium and Magnesium Transfers in Proximal Tubule and Loops of Henle, as Measured by Single Nephron Microperfusion Experiments in the Rat. *Pflügers Arch.*, 333: 1—16, 1972.
- 4) Murayama, Y., Rouffignac, C. De, et Morel, F.: Etude par Microperfusion du Fonctionnement de l'Anse de Henle chez un Rongeur Désertique. *Actualité Néphrologiques de l'Hôpital Necher, Médicales Flammarion, France*, 1971, pp. 91—104.