

原子吸光分光分析法による血清マンガンの測定について

古野 勝志

岡山大学温泉研究所 温泉医学部門

(主任 森永 寛 教授)

(1977年1月22日受付)

1. 序 言

マンガン(Mn)は、生体にとって必須微量元素の1つであり、生体組織や体液中に広く存在しているが、極めて微量であるため、従来、高感度、精確かつ簡便な測定方法がなかった。

近年、原子吸光分光分析法が臨床化学領域に導入され、生体微量元素の測定が簡易となったので、著者は、原子吸光分光分析法による血清Mn測定法の基礎的検討を行ない、この方法は再現性がよく、迅速かつ簡便であることを確かめた。また、健康人および慢性関節リウマチ患者の血清Mnの測定を行ったので報告する。

2. 装置、試薬

2-1 装置

原子吸光分光光度計(日立207型)

ランプ: 日立HLA型Mn中空陰極放電管

バーナー: プレミックス型

燃料: アセチレン—空気

記録計(日立QPD-54型)

低温灰化装置(IPC社製IPC-1003型)

2-2 試薬

3N-, 0.1N-HCl: 特級塩酸を脱イオン蒸留水で希釈し調製した。

過酸化水素水: 特級過酸化水素水を脱イオン蒸留水で、約2倍に希釈した。

Mn標準溶液: 原子吸光分析用Mn標準溶液(和光純薬製)を、0.1N-HClで希釈し2.5 μ g/100ml, 5.0 μ g/100ml, 10.0 μ g/100mlを調製した。なお、ブランクは0.1N-HCl溶液を用いた。

3. 測定条件の検討

3-1 原子吸光分光光度計の使用条件

アセチレン流量について: Mn標準溶液を用いて、空気圧1.8kg/cm², 流量13.0 ℓ /min.と一定に保ち、

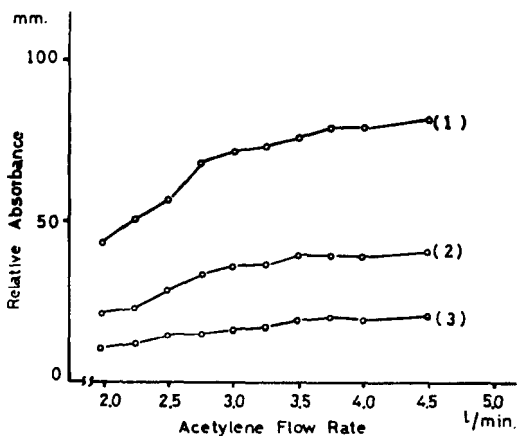


Fig. 1. Effect of acetylene flow rate on the sensitivity of manganese. (1): 20 μ g/100ml. (2): 10 μ g/100ml. (3): 5 μ g/100ml.

アセチレン圧0.5kg/cm²に固定し、流量を2.0~4.5 ℓ /min.の間で変化させた時の吸光度におよぼす影響について検討した(Fig. 1)。流量が増加するに従って、吸光度も増加したが、ノイズも大きくなり、ベースラインが不安定となった。ノイズ最小、炎の良好なのは3.0 ℓ /min.であった。

ランプ電流について: ランプの作動電流を5~17mAの間で変化させた時の吸光度におよぼす影響について検討した(Fig. 2)。ランプ電流が小さくなるに従って、吸光度は増加したが、ノイズも大きくなった。感度が最大で、ノイズが最小となるのは10mAであった。

3-2 各種酸および共存元素による影響 各種酸および共存元素のMn測定におよぼす影響について検討した(Table 1, 2)。酸については、いずれも低濃度(0.1~1.0N)の範囲では、ほとんど影響は認められなかった。しかし、高濃度(3.0N以上)になるに従って、吸光度は減少した。特に、燐酸、硫酸が著明であった。共存元素

Table 1. Effect of acids on the absorbance of manganese.

Acids	Concent. (N)	Absorbance Scale reading (mm)
Hydrochloric acid	0	73.0
	0.1	75.0
	0.5	74.4
	1.0	75.0
	3.0	72.0
	6.0	67.0
Nitric acid	0	73.0
	0.1	75.5
	0.5	75.0
	1.0	74.0
	3.0	72.0
	6.0	68.0
Sulfuric acid	0	73.0
	0.1	75.5
	0.5	74.5
	1.0	74.5
	3.0	68.5
	6.0	59.0
Perchloric acid	0	73.0
	0.1	75.0
	0.5	75.0
	1.0	75.0
	3.0	72.5
	6.0	62.5
Phosphoric acid	0	73.0
	0.1	75.5
	0.5	75.5
	1.0	73.0
	3.0	65.5
	6.0	56.0

Manganese taken : 25 μ g/100ml

については、いずれも著明な影響は認められなかった。

3-3 標準添加法による検討 Fig. 3はMnの標準添加法(血清灰化溶液にMn標準溶液を、それぞれ2.5, 5.0, 10.0 μ g/100ml添加した時の各プロットを結ぶ線を外挿し、Mn濃度を求める方法)による測定値を示したものである。各測定値を結ぶ線は、直線性を示し、標準曲線とよく平行している。

3-4 標準添加法と直接法とから測定したMn値の比較. 血清試料3種(1種類は少量のMnを加えた血清)について、9~12等分し、灰化後、標準添加法と直接法

Table 2. Effect of various cations on the determinations of manganese.

Ions	Amounts of addition (μ g/100ml)	Mn found (μ g/100ml)	Recovery (%)
Na	50	25.6	102.5
	1500	24.7	98.7
	5 \times 10 ⁴	25.3	102.6
K	50	24.6	98.2
	1500	24.7	98.8
	5 \times 10 ⁴	24.4	97.4
Mg	50	24.3	97.2
	1500	23.8	95.0
	5 \times 10 ⁴	25.6	102.6
Ca	50	24.3	97.2
	1500	25.0	100.0
	5 \times 10 ⁴	24.7	98.7
Fe	50	24.4	97.5
	1500	25.0	100.0
	5 \times 10 ⁴	25.3	101.3
Cu	50	24.7	98.8
	1500	25.0	100.0
	5 \times 10 ⁴	25.0	100.0
Zn	50	24.1	96.2
	1500	25.3	101.2
	5 \times 10 ⁴	24.0	96.2
Al	50	24.1	96.2
	1500	25.0	100.0
Ni	50	24.4	97.5
	1500	24.7	98.8
Mo	50	23.4	93.8
	1500	24.4	97.5
Cr	50	24.4	97.5
	1500	25.3	101.2
Au	50	26.3	105.0
	1500	24.4	97.5

Manganese taken : 25.0 μ g/100ml

(標準曲線より算出する方法)により測定した時の両測定値について、その比を算出し、また、変動係数を求めて両方法による再現性を検討した(Table 3)。標準添加法と直接法により算出した両測定値の間には、ほとんど差は認められなかった。また、再現性は、標準添加法では3.3~6.8%、直接法では1.8~8.3%であった。Mn

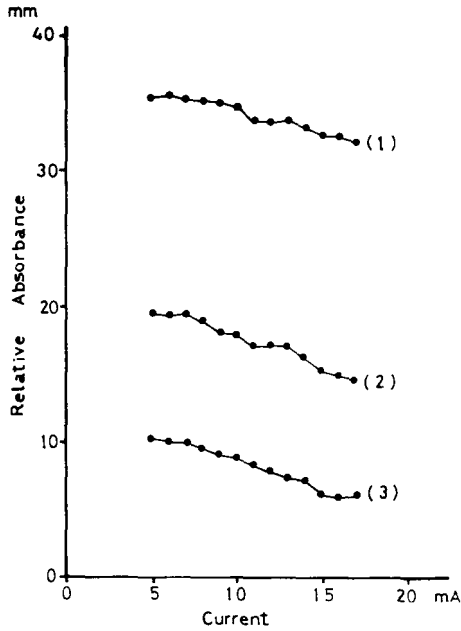


Fig. 2. Effect of lamp current on the sensitivity of manganese. (1) : 20µg/100ml. (2) : 10 µg/100ml. (3) : 5µg/100ml.

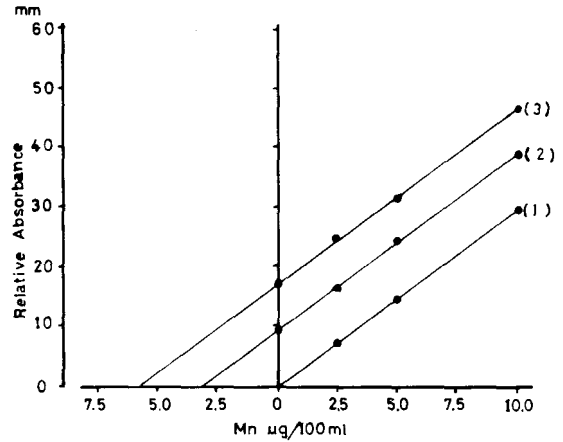


Fig. 3. Serum manganese determination by standard addition method and standard curve. (1) : Mn standard soln, (2) : serum (3) : serum + Mn (2.5µg/100ml)

Table 3. The stability and comparison of the standard addition method and direct method on the determinations of manganese in serum.

N	Sample 1			Sample 2			Sample 3		
	A.M.*	D.M.**	A.M.	A.M.*	D.M.**	A.M.	A.M.*	D.M.**	A.M.
1	3.20	3.06	0.96	14.65	15.00	1.02	3.05	3.30	1.08
2	3.44	3.40	0.99	15.00	15.65	1.04	2.85	3.09	1.08
3	3.04	2.72	0.89	14.90	15.63	1.05	3.10	3.09	0.99
4	3.05	3.40	0.97	14.60	15.63	1.07	3.20	3.30	1.03
5	3.15	3.23	1.03	14.95	15.31	1.02	2.95	2.88	1.05
6	3.00	3.06	1.02	15.38	15.63	1.02	3.20	3.50	1.09
7	3.00	2.72	0.91	15.70	15.31	0.98	3.25	3.30	1.02
8	2.90	3.06	1.05	15.90	15.94	1.00	3.50	3.71	1.06
9	2.95	2.98	0.98	15.90	15.63	0.98	3.50	3.50	1.00
10	3.10	2.72	0.88	15.90	15.63	0.98			
11	2.70	2.68	0.99	15.00	15.94	1.06			
12	3.10	3.06	0.99						
Mean	3.09	3.00	0.97	15.26	15.57	1.02	3.18	3.29	1.04
S.D.	0.21	0.25	0.05	0.51	0.28	0.03	0.21	0.25	0.04
Range	2.70	2.68	0.88	14.60	15.00	0.98	2.85	2.88	0.99
	3.44	3.40	1.05	15.90	15.94	1.07	3.50	3.71	1.09
C.V. (%)	6.8	8.3	5.4	3.3	1.8	3.0	6.6	7.7	3.4

*A.M. : Addition Method (µg/100ml) **D.M. : Direct method (µg/100ml)

S.D. : Standard Deviation. C.V. : Coefficient of variation.

濃度の低い試料ほど、変動係数は高値を示した。

3-5 回収率について 血清の灰化溶液について $5.0 \mu\text{g}/100\text{ml}$ の Mn を添加した時の回収率について検討した (Table 4-a). $92.4\sim 106.0\%$, 平均 100.1% と良好な回収率を得た. 更に, 灰化過程 (低温灰化時) の回収率について, 血清に $\text{Mn } 5.0 \mu\text{g}/100\text{ml}$ を加えて, 灰化し灰化過程の Mn 出納について検討した (Table 4-b). $99.0\sim 102.8\%$, 平均 101.6% であった. すなわち, 灰化過程での汚染, 損失は認められなかった.

Table 4-a. Recovery rate of manganese in ashed serum solution on the determinations.

N	Mn in serum	Mn ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)		Recovery (%)
	($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	Added	Found	
1	1.34	5.0	6.37	100.6
2	1.56	5.0	6.62	101.2
3	1.67	5.0	6.97	106.0
4	2.51	5.0	7.13	92.4
5	2.73	5.0	7.74	100.2
Mean				100.1

Table 4-b Recovery rate of manganese in serum on the ashing process by plasma machine.

N	Mn in serum	Mn ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)		Recovery (%)
	($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	Added	Found	
1	1.48	5.0	6.59	102.2
2	1.95	5.0	7.09	102.8
3	2.47	5.0	7.42	99.0
4	5.44*	5.0	10.55	102.2
Mean				101.6

*Serum + Mn

Table 5. Condition of Mn determination (HITACHI MODEL 207)

wavelength (\AA)	2795
Lamp current (mA)	10
Slit	1
Burner	Premix
Acetylene	
pressure (kg/cm^2)	0.5
flow rate (ℓ/min)	3.0
Air	
pressure (kg/cm^2)	1.8
flow rate (ℓ/min)	13.0

4. 測定試料と測定方法

4-1 測定試料 岡山大学温泉研究所および岡山大学医学部附属病院三朝分院に勤務する職員で, 定期健康診断で異常を認めなかった健常者 40 例 (男性 9 例, 女性 31 例) と, 三朝分院で, アメリカ・リウマチ協会の診断基準に基づき, 慢性関節リウマチと診断された慢性リウマチ患者 26 例 (男性 4 例, 女性 22 例) の血清を測定試料とした.

4-2 測定方法 血清 $1.5\sim 3.0 \text{ml}$ を正確に, パイレックス製灰化皿に取り, 過酸化水素水約 1ml を加え, ゆっくり加熱し蒸発乾固した後, 低温灰化法により灰化した. 灰化装置は, 出力 150W , 酸素流量 $150\text{ml}/\text{min}$. で $3\sim 4$ 時間行った. 灰化後は 3N-HCl 約 2ml を加えて, 蒸発乾固を $2\sim 3$ 回行った. 次に, 残査を 0.1N-HCl で一定量に溶かし測定試料とした. 3 で検討した結果から Table 5 に示す条件で吸光度を測定した.

5. 測定結果

5-1 健常人の血清 Mn 値 健常人 40 例 (男性 9 例, 女性 31 例) の血清 Mn 値を測定した (Fig. 4, Table 6). 健常人 (40 例) は 2.19 ± 0.34 (S. D.) $\mu\text{g}/100\text{ml}$ であった. 男性 (9 例) では 2.39 ± 0.35 (S. D.) $\mu\text{g}/100\text{ml}$, 女性 (31 例) では 2.15 ± 0.31 (S. D.) $\mu\text{g}/100\text{ml}$ で男

Table 6. Serum manganese concentrations in healthy controls and patients with rheumatoid arthritis.

N	Mean \pm S.D.		Range
	($\mu\text{g}/100\text{ml}$) ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)		
Healthy Controls			
Total	40	2.19 ± 0.34	1.57~3.14
Male	9	2.39 ± 0.35	2.05~3.14
Female	31	2.15 ± 0.31	1.57~2.95
Sex difference	(t)	1.98	
	(p)	N.S.	
Rheumatoid Arthritis			
Total	26	3.04 ± 1.01	1.88~6.81
Male	4	3.19 ± 0.70	2.49~4.35
Female	22	3.01 ± 1.05	1.88~6.81
Sex difference	(t)	0.32	
	(p)	N.S.	
Compared with healthy controls and rheumatoid arthritis.	(t)	4.92	
	(p)	$p < 0.001$	

性がやや高値を示したが、両者の間には有意差は認められなかった ($t=1.98 < t_{38} (0.05)=2.02$)。健康人 (40例) の5%棄却限界は、1.51~2.87 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ であった。

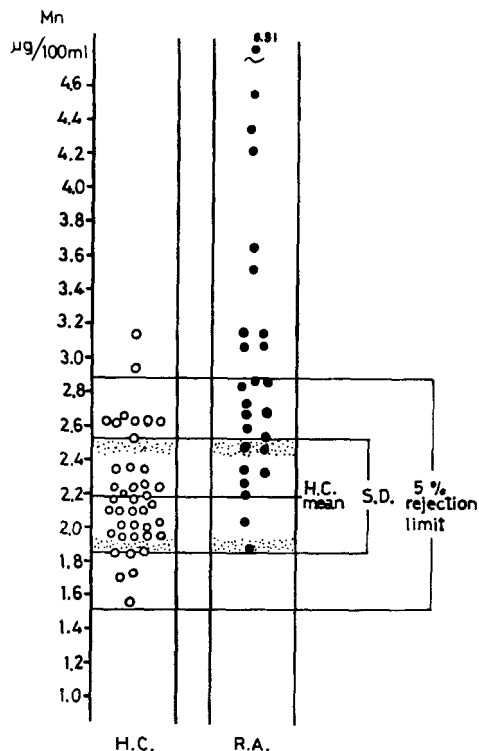


Fig. 4. Serum manganese concentrations in healthy controls and patients with rheumatoid arthritis.
H.C. : Healthy controls. S.D. : Standard deviation.

5-2 慢性関節リウマチ患者の血清 Mn 値 慢性関節リウマチ患者26例 (男性4例, 女性22例) の血清 Mn 値を測定した (Fig. 4, Table 6)。慢性関節リウマチ患者 (26例) は 3.04 ± 1.01 (S.D.) $\mu\text{g}/100\text{ml}$ であった。男性 (4例) では 3.19 ± 0.70 (S.D.) $\mu\text{g}/100\text{ml}$, 女性 (22例) では 3.01 ± 1.05 (S.D.) $\mu\text{g}/100\text{ml}$ で、男性がやや高値を示したが、両者の間には有意差は認められなかった ($t=0.32 < t_{24} (0.05)=2.06$)。健康人に比べ有意 ($p < 0.001$) に高値を示した ($t=4.92 > t_{84} (0.001)=3.46$)。また、慢性関節リウマチ患者26例中10例 (男性2例, 女性8例) (38%) が、健康人の5%棄却限界上限値以上の値を示した。

6. 考 按

生体元素としての Mn 総含有量は、成人で12~20mgと推定されている (UNDERWOOD 1971)。血清中含量では鉄, 銅, 亜鉛に比べて極めて微量であるため、少量の血清試料からの測定では、操作過程 (特に灰化時) での汚染や損失が、測定誤差となりうる。

血清は灰化処理を必要とするが、一般に、高温灰化では揮散損失が、湿式灰化では、多量に用いられる各種酸化剤中の不純物による汚染, などが問題となる。本測定法で用いた低温灰化法は、高周波放電下で励起された原子状酸素が、試料を酸化分解し、灰化は気密チャンパー内で、室温~150°C前後で行なわれるために汚染, 損失は極めて少ないと言われる。このことは、著者の灰化過程の回収率の成績からも理解できよう。

灰化後の試料溶液について、標準添加法と直接法による測定値には、ほとんど差がみられなかった。藤井 (1971), SUZUKI ら (1974) も、生体試料の灰化溶液について、両方法による測定値の間には、ほとんど差がみられ

Table 7. Normal value of serum manganese concentrations in various reports.

Author	Year	Method	Mean \pm S.D. ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	Range ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)
KANABROCKI	1964	NAA	1.3 ± 0.2	0.9~1.8
MERTZ	1968	ES	1.6	0.05~21.0
COTZIAS	1968	NAA	0.14 ± 0.02	
MAHONEY	1969	AAS	2.4 ± 0.7	1.2~3.8
NIEDERMEIER	1971	ES	2.4 ± 3.3	0~14.0
VERSIACK	1974	NAA	0.057 ± 0.013	0.038~0.104
This report	1977	AAS	2.19 ± 0.34	1.57~3.14

AAS : Atomic Absorption Spectrophotometry ES : Emission Spectrography
NAA : Neutron Activation Analysis

なかったと報告している。一般に、標準添加法では、多量の試料を必要とし、また、希釈によって吸光度が小さくなるなどの欠点がある。直接法では、試料は少量ですみ、また、簡便性の点からも有利である。

血清 Mn の正常値について、諸家の報告から引用し比較した (Table 7)。KANABROCKI ら (1964)、MRETZ ら (1968)、MAHONEY ら (1969)、NIEDERMEIER ら (1971) の報告とは、ほぼ同様の値であったが、COTZIAS ら (1968)、VERSIECK ら (1974) の報告とは大差がみられた。

血清 Mn の臨床的意義に関して、HEDGE ら (1961) は、急性冠動脈閉塞後、血清 Mn が上昇するし、血清 GOT より良好な相関性を示したと報告している。また、リウマチ患者について、NIEDERMEIER ら (1971) は、血清 Mn は有意に上昇したと報告し、著者の成績とも一致した。一方、COTZIAS ら (1968) は、赤血球中 Mn は有意な上昇を示したが、血清 Mn では上昇傾向にあったと報告している。

いずれにせよ、血清 Mn に関する臨床的研究報告は、極めて少ないのが現状であるが、測定技術が広く普及すれば鉄、銅、亜鉛について、生体微量元素としての臨床的意義は大きくなるものと思われる。

7. 結 語

原子吸光分光光度計 (日立 207 型) による、血清 Mn 測定法の基礎的諸条件を検討した。原子吸光分光分析法により健常人 40 例 (男性 9 例, 女性 31 例)、慢性関節リウマチ患者 26 例 (男性 4 例, 女性 22 例) について、血清 Mn の測定を行った。

- ①波長 2795 Å, アセチレン流量 3.0 l/min., ランプ電流 10 mA の条件下で最も良好な測定結果が得られた。
- ②共存元素、酸の化学的因子の影響は少なく、測定特異性が高いことが認められた。
- ③同一灰化溶液について、標準添加法 (血清灰化溶液に Mn 標準溶液を、添加した時の吸光度の各プロットを結ぶ線を外挿し、Mn 濃度を求める方法) と直接法 (標準曲線より算出する方法) の両方法による測定値の間には、ほとんど差がみられなかった。
- ④再現性については、変動係数は 3.3~6.8% (標準添加法)、1.8~8.3% (直接法) であった。
- ⑤回収率については、測定時の回収率は 100.1%, 灰化時の回収率は 101.6% であった。
- ⑥健常人 40 例の血清値は 2.19 ± 0.34 (S.D.) $\mu\text{g}/100\text{ml}$ であった。男性 (9 例) は 2.39 ± 0.35 (S.D.) $\mu\text{g}/100$

ml, 女性 (31 例) は 2.15 ± 0.31 (S.D.) $\mu\text{g}/100\text{ml}$ で、有意な性差は認められなかった。慢性関節リウマチ患者 26 例の血清 Mn 値は 3.04 ± 1.01 (S.D.) $\mu\text{g}/100\text{ml}$ で、健常人に比べて有意 ($p < 0.001$) に高値を示した。慢性関節リウマチ患者 26 例中 10 例 (38%) が、健常人の 5% 棄却限界の上限値を超えた。

文 献

- COTZIAS, G.C. *et al.* (1968) Slow turnover of manganese in active rheumatoid arthritis accelerated by prednison. *J. Clin. Invest.*, **47**, 992-1001.
- 藤井信夫 (1971) 原子吸光分析法による毛髪中 Mn の測定法。四国医誌, **27**, 568-572.
- HEGDE, B., GRIFFITH, G.C., BUTT, E.M. (1961) Tissue and serum manganese levels in evaluation of heart muscle damage. A comparison with SGOT. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **107**, 734-737.
- KANABROCKI, E. L. *et al.* (1964) Neutron activation studies of biological fluids: manganese and copper. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **15**, 175-190.
- MAHONEY, J.P. *et al.* (1969) Studies on manganese, Determination in serum by atomic absorption spectrophotometry. *Clin. Chem.*, **15**, 312-322.
- MERTZ, D.P. *et al.* (1968) Untersuchungen über den stoffwechsel von spurenelementen beim menschen. *Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem.*, **6**, 171-174.
- NIEDERMEIER, W., PRILLAMAN, W.W., GRIGGS, J.H. (1971) The effect of chrysotherapy on trace metals in patients with rheumatoid arthritis. *Arth. Rheum.*, **14**, 533-538.
- SUZUKI, M., WACKER, W.E.C. (1974) Determination of manganese in biological materials by atomic absorption spectroscopy. *Anal. Biochem.*, **57**, 605-613.
- UNDERWOOD, E.J. (1971) *Trace elements in human and animal nutrition.* (3rd Edition) pp 179, Academic press, New York and London.
- VERSIECK, J. *et al.* (1974) Normal manganese concentrations in human serum. *Acta Endocrinol.*, **76**, 783-788.

DETERMINATION OF MANGANESE IN SERUM BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY.

by Katsushi FURUNO (Director : Prof. H. MORINAGA) *Division of medicine Institute for Thermal Spring Reserch, Okayama University.*

Abstract. The manganese (Mn) concentrations in serum of 40 healthy controls (9 males and 31 females), and of 26 patients with rheumatoid arthritis (4 males and 22 females) were determined using a HITACHI MODEL 207 atomic absorption spectrophotometer.

Wavelength of Mn determination was setted at 2795 Å. Flow rate of acetylene was setted at 3.0 l/min and lamp current was setted at 10 mA. The serum samples were ashed by IPC MODEL 1003 plasma machine, and dissolved in 3N-HCl and

evapolate on the hot plate, and redissolved in constant volume of 0.1 N-HCl. These sample solution were aspirated directly into the burner.

Mn levels in serum were estimated by standard curve. The mean recovery rate of ashed-sample solution was 100.1%, and that of serum by ashing process was 101.6%.

The serum Mn levels in 40 healthy controls and 26 patients with rheumatoid arthritis were 2.19 ± 0.34 (S.D.), 3.04 ± 1.01 (S.D.) $\mu\text{g}/100\text{ml}$ respectively. The serum Mn levels in rheumatoid arthritis were significantly higher than healthy control levels ($p < 0.001$).

In 10 of 26 cases (38%) with rheumatoid arthritis, the serum Mn levels were shown to be above the upper limit of 5% rejection limit of healthy controls.