

## カルセインを指示薬とするキレート滴定による カルシウム定量法の検討—Ⅱ—

血清中の総カルシウムと透析性カルシウムの定量法

石原 忠・桑野絃一・保田正人

### Determination of Calcium by Chelometry Using Calcein-Ⅱ.

Determination of the Total Calcium and the Dialysate  
Calcium in Blood Serum

Tadashi ISHIHARA, Koichi KUWANO and Masato YASUDA

For the estimation of the blood serum calcium, the YANAGISAWA method of colorimetry, and the chelate titration method with EDTA-2Na using Eriochrome Black T and Murexide as the indicators are generally used, but these methods are found to have some defects.

The authors reported in a previous paper an improved method of the chelate titration in which they used calcein, a kind of chelate indicator, to determine the conditions of estimation of calcium in drinking water and sea water. In our present experiment, this method has been employed for the estimation of total blood serum calcium and dialysate calcium, and it brought about a very satisfactory result. The method proved to be the same as the YANAGISAWA method in accuracy and by far more advantageous than that in its simple experimental operation and in the shortening of the time needed.

血清中の Ca は透析性 Ca と非透析性 Ca とよりなり、生理、代謝状態と密接な関係をもつ<sup>1)~6)</sup>もので、特に前者の変動は臨床医学の一指標として広く用いられている。血清中の Ca の定量方法としては透析性 Ca を定量出来る点で柳沢法<sup>7)~9)</sup> (比色定量法)が多く利用されている。しかしこの方法は操作に若干の熟練を要し、高精度を保持するためには常に標準溶液による検量線の補正が必要であり、さらに色調の安定性が短かい故、多数の検体を測定するにはかなりの労力を必要とする。一方キレート滴定法には Murexide<sup>10)11)</sup>やEriochrome Black T<sup>12)</sup>を指示薬とし、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水塩 (2Na・EDTA と略)で滴定する方法があるが、滴定の判定が困難であり、かつ透析性 Ca の定量法については報告されていない。Eriochrome Block T を使

用するものでは Ca と Mg の和から Mg 量を差引いて Ca 量を求めるやや煩雑な操作を要している。

著者等は前法<sup>13)</sup>で飲料水や海水の Ca 定量にカルセインを指示薬とし、2Na・EDTA で滴定する方法の改良法を報告した。この方法は、DIEHL<sup>14)</sup>、YALMAN<sup>15)</sup>、BELCHER<sup>11)</sup>等の方法を主に指示薬濃度の点で改良したものであり、血清総 Ca と透析性 Ca の定量に利用したところ定量法として非常に有利な結果を得たので報告する。

## 実 験 方 法

### 試 薬

- (1) Ca 標準液：比色用標準試薬（第一化学薬品製）1.00mg Ca/ml を蒸留水で希釈し 107g Ca/ml とする。
- (2) 滴定液：DOTITE 硬度滴定液（0.02N 2Na・EDTA 同仁薬化学研究所製）を蒸留水で40倍に希釈し 0.005N 溶液とする。この溶液 1ml は 107g Ca に相当する滴定液となる。
- (3) 指示薬：カルセイン 10mg を 1N KOH の 10ml に溶解し蒸留水で 100ml とし冷所に保存する。試薬の調製にはすべてイオン交換水の上質なものを二度蒸溜し、カルセインにて Ca の全く存在しないことを確認した水を用い、器具もすべてこの蒸留水で数回の洗滌を行った。

### 定 量 法

#### 1. 血清総カルシウムの定量法

新鮮な血清の一定量（0.04～0.1ml）をマイクロピペットで 50ml 客びーカーにとり、1N KOH であらかじめ pH 13.5～14.0 に調製した水約 6ml と指示薬 1～2 滴を加え間接光下で白色板をバックにして滴定し、緑色蛍光が消失し赤色に変わった点を終点とする。この場合一度赤色が出現するが軽く振るとまた緑色蛍光が現れるのでこれを注意深くくりかえし、少くとも30秒位よく振って赤色が消失しなくなる点を終点とする。滴定量を Aml とする。

#### 2. 透析性カルシウムの定量法

血清に4%シュウ酸アンモニウムを加え放置した場合のシュウ酸とCaの結合<sup>7)8)</sup>は、初めの1～5分間に透析性 Ca が結合するが、非透析性 Ca との結合はそれ以後非常に緩慢に進行し完了するまでには数時間を要するとされている。この性質を利用し血清の 0.1 ml をポリ製遠心管にとり、1%シュウ酸 3.9ml を加え直ちに 8000r.p.m. で1分間遠心し、透析性 Ca のシュウ酸塩を遠心沈澱された後、上澄の 2ml を 50ml 容びーカーに取り、1N KOH で pH14.5 に調製した水約 8ml を加えて、前記の総 Ca と同様に滴定を行った。滴定量を Bml とする。ついで対照として蒸留水 0.1ml に 1%シュウ酸 3.9 ml を加えたものから 2ml を取り、同様に滴定を行う。滴定量を Cml とする。この方法でシュウ酸アンモニウムを使用するとアンモニウムイオンによる滴定妨害が著しいため、シュウ酸を使用した。なお 1.2. いずれの場合も試料に所定の試薬を加え同様操作したものに 1～2 滴過剰に 2 Na・EDTA を加えたものを俥におき滴定終点の判定材料とすると

好都合である。

**計算方法**

血清 0.1ml を使用した時その中に含まれる Ca 7g は、

$$\text{総カルシウム} = 10 \times A$$

$$\text{非透析性カルシウム} = 20 (B - C)$$

$$\text{透析性カルシウム} = 10A - \{20(B - C)\}$$

**実 験 成 績**

1. 血清総カルシウムの定量

同一血清の一定量 0.04, 0.06, 0.08, 0.10ml をマイクロピペットで 50ml 容ビーカーにとり、上記の方法で各血清量に対し10回の測定を行った。結果は Table 1 に示すよう

Table 1. キレート滴定法による血清総カルシウムの定量成績  
試料は同一血清を使用

血清量 ml	0.04	0.06	0.08	0.1
カルシウム定量値 (%)	4.13	6.02	8.15	10.27
	4.13	6.19	8.17	10.26
	4.12	6.15	8.14	10.25
	4.08	6.18	8.20	10.21
	3.97	6.05	8.18	10.28
	4.07	6.14	8.23	10.25
	4.16	6.13	7.95	10.11
	4.10	6.06	8.17	10.18
	4.01	6.09	8.10	10.09
	3.99	6.01	8.07	10.17
M±σ	4.07±0.05	6.10±0.06	8.14±0.07	10.21±0.07

にかなり一定した滴定値を示し充分定量に用いられると思えた。しかし血清中の真の総Ca量は不明のため、この定量値が真の値であるか疑問であるので、血清に Ca 標準液の一定量を添加して、その回収試験を試みた、結果は Table 2 に示すように初期の目的をみたく結果を得た。

さらに同一血清を用いて柳沢法との比較を行ない、Table 3 の結果を得た。この結果と Table 1 の結果を比較すると、平均値もほとんど変わらず、標準偏差も近似し本法により充分信頼出来る定量値の得られることを認めた。

Table 2. キレート滴定法によるカルシウム添加回収試験成績  
試料は Table 1. と同一血清を使用

血清 ml + カルシウム標準液 ml					
0.04ml+0.6ml		0.06ml+0.4ml		0.08ml+0.2ml	
Ca 定量値 $\gamma$ g	Ca定量値-6.0	Ca 定 量 値	Ca定量値-4.0	Ca 定 量 値	Ca定量値-2.0
10.10	4.10	10.05	6.05	10.09	8.09
10.08	4.08	10.15	6.15	10.20	8.20
10.02	4.02	10.02	6.02	10.18	8.18
9.96	3.96	10.14	6.14	9.93	8.03
10.15	4.15	10.13	6.13	10.10	8.10
10.05	4.05	10.06	6.06	10.07	8.07
10.06	4.06	10.09	6.09	9.95	8.05
10.12	4.12	10.04	6.04	10.25	8.25
9.98	3.98	10.18	6.18	10.20	8.20
10.13	4.13	10.03	6.03	10.21	8.21
M $\pm\sigma$	4.07 $\pm$ 0.06	M $\pm\sigma$	6.09 $\pm$ 0.05	M $\pm\sigma$	8.14 $\pm$ 0.07

Table 3. 柳沢法による血清総カルシウムの定量成績  
試料は Table 1.2 と同一血清を使用

血清量 ml	0.04	0.06	0.08	0.10
	4.05	6.01	8.13	10.25
	4.06	6.06	8.10	10.27
	4.03	6.16	8.05	10.18
	4.14	6.06	8.18	10.14
	4.13	6.11	8.10	10.15
	4.03	6.14	8.15	10.28
	3.98	6.03	8.19	10.21
	4.12	6.18	8.12	10.16
	4.05	6.10	8.00	10.29
	4.01	6.08	8.03	10.17
M $\pm\sigma$	4.06 $\pm$ 0.05	6.09 $\pm$ 0.05	8.14 $\pm$ 0.07	10.21 $\pm$ 0.06

2. 血清透析性カルシウムの定量

同一血清の 0.1ml に対し上記方法で透析性 Ca を定量し、柳沢法との比較を行なった。結果はTable 4 に示す如く、柳沢法と遜色のない結果が得られた。以上の方法を用いて健康な本学学生20名について血清総 Ca, および透析性 Ca を測定したところTable 5 に示すように何れも正常値の範囲内に止まった。

Table 4. 血清透析性カルシウム定量の柳沢法との比較

定量法 Ca型	キレート滴定法			柳沢法		
	総 Ca	非透析性Ca	透析性Ca	総 Ca	非透析性Ca	透析性Ca
カルシウム 定量値 γg/0.1ml	9.88	5.64	4.24	9.90	5.70	4.20
	9.91	5.66	4.25	9.91	5.68	4.23
	9.93	5.74	4.19	9.90	5.70	4.20
	9.88	5.68	4.20	9.88	5.70	4.18
	9.85	5.70	4.15	9.90	5.68	4.22
	9.90	5.70	4.20	9.92	5.72	4.20
	9.93	5.76	4.17	9.92	5.71	4.21
	9.90	5.64	4.26	9.87	5.72	4.15
	9.86	5.72	4.14	9.94	5.73	4.21
	9.96	5.74	4.22	9.93	5.74	4.19
M	9.90	5.70	4.21	9.90	5.71	4.20

Table 5. 健康成人男人の血清カルシウムのキレート滴定法による測定例 (γg/0.1ml)

No.	総Ca(A)	透析性(B)	(B)/(A)×100	No.	総Ca(A)	透析性(B)	(B)/(A)×100
1	10.81	44.5	41.2	11	9.94	4.32	43.5
2	10.72	4.50	42.0	12	9.83	4.16	42.3
3	10.52	4.38	41.6	13	9.70	4.20	43.3
4	10.43	4.40	42.2	14	9.65	3.94	40.8
5	10.38	4.42	42.6	15	9.64	3.77	39.1
6	10.24	4.32	42.2	16	9.59	3.90	40.7
7	10.21	4.35	42.6	17	9.56	3.76	39.3
8	10.09	3.97	39.3	18	9.53	3.66	38.4
9	10.07	4.28	42.5	19	9.49	3.34	35.2
10	10.05	4.22	42.0	20	9.45	3.55	37.6

## 摘 要

血清のカルシウムの定量法として一般に利用されている柳沢法は精度の点では充分であるが、操作の煩雑さと、若干の熟練を要する点、および多数の試料の処理が困難といった難点をもっている。キレート滴定の従来の方法ではやはり難点が多く、かつ透析性カルシウムの定量法がなされていなかったが、我々が水のカルシウム定量に使用したカルセインを指示薬とする方法を拡張した滴定法ではシュウ酸添加により透析性カルシウムを沈澱させて除去し、非透析性カルシウムを簡便に分析出来る点は血液の生理化学的研究に有意義なものとする。定量精度も柳沢法と比較し遜色なく、このことは回収実験成績により証明された。

## 文 献

- 1) 柳沢・永瀬：栄養と食糧，7，1，1 (1954)。
- 2) 柳沢・永瀬・小笠原：同誌，7，2，9 (1954)。
- 3) 柳沢・藤井：同誌，7，3，4 (1954)。
- 4) 柳沢・藤井・小笠原・霜田：同誌 7，3，7 (1954)。
- 5) 柳沢・藤井：同誌，8，3，25 (1955)。
- 6) 柳沢・永瀬：同誌，8，5，10 (1956)。
- 7) 柳沢文正：化学の領域増刊，33，13 (1958)。
- 8) 柳沢文正：栄養と食糧，10，3，1 (1957)。
- 9) 柳沢文正：光電比色法の実際，共立出版 p.68 (1955)。
- 10) ドータイト分析シリーズ。No. 4の1，同仁薬化学研究所発行。
- 11) BELCHER, R.A.CLOSE. et al : *Talanta*, 1, 238 (1958)。
- 12) 石井 暢：医学と生物学，24，1，9 (1952)。
- 13) 石原・保田：本誌，17，110 (1964)。
- 14) HARVEY DIEHL and JOHN L. ELLINGBO : *Anal. Chem.*, 28, 882 (1958)。
- 15) RICHARD G. YALMAN, et al : *Anal. Chem.*, 31, 1230(1959)。