報 文

2-(5-ニトロ-2-ピリジルアゾ)-5-(*N*-プロピル-*N*-スルホ
プロピルアミノ) フェノールを用いる血清中の鉄, 銅,
亜鉛の分別吸光光度定量大野 典子^{**}, 酒井 忠雄^{**}Spectrophotometric determination of iron, copper and zinc in sera using
2-(5-nitro-2-pyridylazo)-5-(*N*-propyl-*N*-sulfoethylamino)phenolNoriko OHNO^{*} and Tadao SAKAI^{**}^{*}Chemistry Laboratory, School of Business Administration, Asahi University, 1851, Hozumi,
Hozumi-cho, Motosu-gun, Gifu 501-02^{**}Department of Applied Chemistry, Aichi Institute of Technology, 1247, Yachigusa,
Yakusa-cho, Toyota-shi, Aichi 470-03

(Received 16 July 1997, Accepted 30 August 1997)

2-(5-Nitro-2-pyridylazo)-5-(*N*-propyl-*N*-sulfoethylamino) phenol (nitro-PAPS) reacts with iron(II), copper and zinc, but not with iron(III). The iron(II) complex is formed at pH 3.4~9 and has an absorption maximum at 582 nm. Copper forms a 1:1 complex at pH 2.5~4.5 and a 1:2 complex at pH 8~9. Zinc reacts at pH 8~9. The absorption maxima of copper and zinc complexes are at 565 nm. When sodium periodate was added to a sample solution containing copper, iron and zinc at pH 3.5, only the copper complex was formed. Accordingly, only copper could be determined. On the other hand, the sum content of iron and copper was determined in the presence of ascorbic acid at pH 3.5. Also, the total contents of iron, copper and zinc were determined at pH 8.5. Three metal ions in the range of 0.02~0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ could be determined individually and the proposed method is useful for determinations in sera.

Keywords : determination of iron, copper and zinc; serum; 2-(5-nitro-2-pyridylazo)-5-(*N*-propyl-*N*-sulfoethylamino)phenol.

1 緒 言

鉄, 銅, 亜鉛の比色定量試薬として, 従来より, *o*-フェナントロリン, クプロイン, ジンコン¹⁾などが使われているが, これらのモル吸光係数は $(1\sim2)\times 10^4\text{ l}$

$\text{mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ 程度であり高感度とは言えない。そこで金属キレート陽イオンをモル吸光係数の大きな陰イオンで抽出し, 金属を高感度で定量する試みがなされた。例えば陰イオンとして, 一塩基酸色素であるテトラプロモフェノールフタレインエチルエステル (TBPE, $\epsilon \approx 1 \times 10^5$) を用いて, 銅-クプロインキレートを有機溶媒に抽出する方法がある。この会合体のモル吸光係数は 9.6×10^4 であった²⁾。又, 鉄は 3-(2-ピリジル)-5,6-ジフェニル-1,2,4-トリアジン (PDT) と二価の錯イオンを形

^{*} 朝日大学経営学部化学教室: 501-02 岐阜県本巣郡穂積町穂積 1851

^{**} 愛知工業大学工学部応用化学科: 470-03 愛知県豊田市八草町八千草 1247

成するので、 $\text{Fe}(\text{PDT})_3(\text{TBPE})_2$ 会合体を有機溶媒に抽出すると、 1.9×10^5 のモル吸光係数が得られ、高感度に鉄を定量することができた³⁾。一方、 10^5 オーダーのモル吸光係数を持つ抽出比色試薬の開発も行われ高感度化が図られた⁴⁾⁵⁾。

しかし、抽出定量法はやや操作が煩雑になる上、器具の洗浄や有機溶媒の後処理が必要となり、又環境保護から揮発性有機溶媒の使用が制限されつつあり、現在では好ましい方法とは言えなくなっている。そこで、高感度であり更に水溶性の高いキレート試薬の開発が試みられた。喜納らは 2-ニトロソ-5-(*N*-プロピル-*N*-スルホプロピルアミノ)フェノール(ニトロソ-PSAP)⁶⁾、2-(5-プロモ-2-ピリジルアゾ)-5-(*N*-プロピル-*N*-スルホプロピルアミノ)アニリン(5-Br-PSAA)⁷⁾を開発した。著者らはこれらの試薬を用い、高感度化が図れるフローインジェクション法に応用したところ、ppb オーダーの鉄⁸⁾やパラジウム⁹⁾の定量が可能となった。Makino らは、2-(5-プロモ-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(5-Br-PAPS)¹⁰⁾や 2-(5-ニトロ-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(ニトロ-PAPS)¹¹⁾を用いた血清中の亜鉛の定量を、Hayashibe らは 5-Br-PAPS を用いた血清亜鉛の FIA 分析¹²⁾を報告している。これらの定量法は 1 種類の金属イオンを対象としたものである。そこで著者らは新しい検出システムを構築し複数成分の分別定量を検討し、血清中の鉄と銅の 2 成分同時定量¹³⁾を試みた。今回ニトロ-PAPS と金属の反応を検討したところ、反応条件により鉄、銅、亜鉛との錯生成が異なることを見だし、これら 3 金属イオンの分別定量を試み良好な結果を得たので報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

$\text{Fe}(\text{II})$ 標準溶液 (1 mg ml^{-1}): 適量の硫酸鉄(II) アンモニウム・六水和物(キシダ化学製)を水に溶かし、塩酸を加え 0.1 M 塩酸溶液とした。使用に際し適宜希釈した。

$\text{Fe}(\text{III})$, $\text{Cu}(\text{II})$, $\text{Zn}(\text{II})$ 各標準溶液 (1 mg ml^{-1}): 原子吸光用標準溶液(ナカライテスク製)を用い、適宜希釈して使用した。

ニトロ-PAPS 溶液 ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$): 2-(5-ニトロ-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、二ナトリウム塩、二水和物(ドータイト製)を水に溶かし調製した。

緩衝液: 0.1 M 酢酸ナトリウム- 0.1 M 酢酸混合溶液、

又は 0.3 M リン酸二水素ナトリウム- 0.1 M ホウ酸ナトリウム混合溶液に、 3 M 硫酸又は 6 M 水酸化ナトリウムを加え pH を調節した。

アスコルビン酸溶液 (1%) 及び過ヨウ素酸ナトリウム溶液 (0.025%): *L*-アスコルビン酸及びメタ過ヨウ素酸ナトリウム(以上、キシダ化学製)の適量を水に溶かし調製した。

除タンパク剤: 10 g のトリクロロ酢酸(キシダ化学製)を水にとかし、濃塩酸 8.5 ml 加え、更に水を加えて全量を 100 ml にした。

血清は市販血清(Irvine Scientific 製, USA)及び採血血清を用いた。

すべての試薬は市販の特級を、水は蒸留水を用いた。

2.2 装 置

吸光度及び吸収スペクトルの測定には、日立 556 型ダブルビーム自記分光光度計を用い、セルは光路長 10 mm の石英セルを使用した。pH の測定には、日立堀場製 F-7 II 型 pH メーターを用いた。遠心分離には、クボタ製 KS-4000 型遠心分離器を用いた。又、セイコー電子工業製 JY38P II 型 ICP 発光分析装置を使用した。

2.3 標準操作

(1) 鉄、銅、亜鉛が総濃度で $0.02 \sim 0.5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ 含まれる試料溶液を 25 ml のメスフラスコに採る。これに 0.025% 過ヨウ素酸ナトリウム溶液 1 ml を添加し 20 分間放置する。緩衝液 (pH 3.5) 5 ml と $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ ニトロ-PAPS 溶液 1 ml を加え、更に水を加え一定量とする。565 nm における吸光度を 5 分以内に測定し、この値を A_1 とする。

(2) 試料溶液に 1% アスコルビン酸溶液 1 ml , $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ ニトロ-PAPS 溶液 1 ml を加え、更に緩衝液 (pH 3.5) 5 ml と水を加え一定量とする。565 nm における吸光度を測定し、この値を A_2 とする。

(3) 試料溶液に 1% アスコルビン酸溶液 1 ml , $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ ニトロ-PAPS 溶液 1 ml を加え 2 分間放置する。緩衝液 (pH 8.5) 5 ml と水を加え一定量とする。565 nm における吸光度を測定し、この値を A_3 とする。

A_1 は銅の含有量、 A_2 は銅と鉄の含有量、 A_3 は銅、鉄、亜鉛の含有量に相当する。

3 結果と考察

3.1 吸収スペクトル

鉄、銅、亜鉛とニトロ-PAPS とのキレートの吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。それぞれの金属イオンの濃

Fig. 1 Absorption spectra of metal complexes with nitro-PAPS

1: $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ iron, pH 3.5; 2: $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ copper, pH 3.5; 3: $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ copper, pH 8.5; 4: $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ zinc, pH 8.5; 4×10^{-5} M nitro-PAPS. Reference: reagent blank

度は $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ である。曲線 1 は鉄の吸収スペクトルで 582 nm に吸収極大を示す。曲線 2 と 3 は銅の吸収スペクトルで吸収極大波長は 565 nm である。曲線 3 は pH 8.5 におけるスペクトルで、ピークの形は pH 3.5 のとき (曲線 2) と同じであるが、吸光度がほぼ 2 倍となった。これは、pH 3.5 では 1:1 キレート、pH 8.5 では 1:2 キレートを生成するためと思われる。亜鉛キレートの吸収極大波長は 565 nm であった (曲線 4)。

3・2 pH の影響

それぞれの金属イオンを単独で含む試料について、キレート生成に及ぼす pH の影響を検討し、Fig. 2 に結果を示す。曲線 1 に鉄(II)、曲線 2 に銅、曲線 3 に亜鉛の pH 領域を示す。鉄(II) は pH 3.4~9.0 の広い範囲でキレートを生成した。銅は pH 2.5~4.5 で 1:1 キレートを、pH 8~9 で 1:2 キレートを生成した。亜鉛の最適 pH 領域は 8~9 であった。

鉄は二価のみが反応し、三価は反応しない。つまり、還元剤存在下ではキレートを生成するが、酸化剤を存在させると生成しないことが分かった。又、亜鉛は pH 4 以下ではキレートを生成しない。従って、鉄、銅、亜鉛の 3 金属イオンが共存した場合、pH 3.5 で酸化剤を添加することによって鉄と亜鉛の反応を抑えて、銅のみを反応させることができ、その吸光度 A_1 が測定される。還元剤を共存させた場合銅と鉄が反応するので、両者の

Fig. 2 Effect of pH on the formation of metal complexes

1: $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ iron, wavelength 582 nm; 2: $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ copper, wavelength 565 nm; 3: $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ zinc, wavelength 565 nm; 4×10^{-5} M nitro-PAPS. Reference: reagent blank

含量の吸光度 A_2 が測定される。又、pH 8.5 では 3 金属イオンとも反応するので、鉄、銅、亜鉛の含量の吸光度 A_3 が測定される。以上から鉄、銅、亜鉛の 3 成分を分別定量することができる。

3・3 酸化剤、還元剤及び試薬濃度の影響

過ヨウ素酸ナトリウムによる鉄(II)の酸化について検討した。 $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ の鉄(II)溶液に 0.025% 溶液を 0.5 ml 以上添加したところ、完全に酸化された。又、鉄、銅、亜鉛の混合試料については、1 ml 以上の添加で、鉄を含まない銅、亜鉛混合試料の吸光度と同じになり、鉄が完全に酸化されたと考えられる。従って、鉄の酸化のために 0.025% 過ヨウ素酸ナトリウム溶液を 1 ml (最終濃度 $1 \times 10^{-3}\%$) 添加することとした。

過ヨウ素酸ナトリウムを添加して鉄を三価に酸化した後、ニトロ-PAPS 溶液を添加する。しかし吸光度測定までに時間を要すると、吸光度の増加が見られた。又、鉄(II)-ニトロ-PAPS キレート形成後に過ヨウ素酸ナトリウムを添加しても酸化分解できなかった。このことから過ヨウ素酸ナトリウムが存在しても、徐々に鉄キレートが形成されるものと考えられる。そこでニトロ-PAPS 添加後の放置時間について検討したところ、5 分間までは吸光度の増大は見られなかったが、それ以上放置すると徐々に吸光度が増大した。従って、ニトロ-PAPS 添加後 5 分以内に測定を行った。

酸化剤として、過ヨウ素酸ナトリウムのほか、過酸化水素水と過塩素酸ナトリウムについて検討したが、過酸

Table 1 Effect of diverse ions in the determination of 0.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of Cu

Concentration/ $\mu\text{g ml}^{-1}$	Ion	
	pH 3.5	pH 8.5
2	ClO_4^- , Br^- , I^- , Cl^- , CH_3COO^- , Cr^{3+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Pt^{4+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Al^{3+} , Se^{4+} , W^{6+} , Hg^{2+}	ClO_4^- , Br^- , I^- , Cl^- , CH_3COO^- , Cr^{3+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Pt^{4+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Al^{3+} , Se^{4+} , W^{6+} , Si^{4+} , Sn^{2+}
1.5	Si^{4+} , Sn^{2+}	Hg^{2+}
0.01	Ni^{2+}	Ni^{2+} , Co^{2+}
0.005	Co^{2+}	

化水素水と過塩素酸ナトリウムは鉄(II)を鉄(III)に完全に酸化することができなかった。

還元剤としてアスコルビン酸を用いた。銅、亜鉛のキレート生成には全く影響を与えなかった。0.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ の鉄(III)溶液にアスコルビン酸を添加し濃度の影響を検討した。1% アスコルビン酸溶液の添加量が0.1~4 mlの範囲で一定の吸光度が得られた。このときの吸光度は鉄(II)溶液の吸光度と一致したので、完全に二価に還元されたと考えられる。従って1% アスコルビン酸溶液1 ml (最終濃度0.04%)を添加した。

0.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ の鉄(II)と0.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ の銅を含む混合溶液に、 $(0.5\sim6)\times 10^{-5}\text{ M}$ の濃度範囲でニトロ-PAPSを添加してその影響を検討した。pH 3.5とpH 8.5の両方を検討した。両pHとも $3.5\times 10^{-5}\text{ M}$ 以上で一定の吸光度が得られた。試薬空試験液も吸収を示すので、ニトロ-PAPS溶液は $4\times 10^{-5}\text{ M}$ ($1\times 10^{-3}\text{ M}$ 溶液を1 ml)添加することとした。

3・4 共存イオンの影響

0.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 銅に種々の陽イオン、陰イオンを共存させた試料について、標準操作に従って操作し吸光度に及ぼす影響を検討したところ、 $\pm 3\%$ の誤差範囲内の吸光度が得られた。その結果をTable 1に示す。

塩化物イオン、臭化物イオン、酢酸イオン等の陰イオンや鉛、アルミニウム、カドミウム、バリウムなどの陽イオンは1.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 以上共存しても妨害しなかった。血清中のカルシウム、マグネシウムは100, 20~60 $\mu\text{g ml}^{-1}$ とされているが、Makinoの報告¹¹⁾では定量に影響を与えないので、本実験では許容限界まで検討しなかった。ニッケルは0.01, コバルトは0.005 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 以上共存するとプラスの妨害を与えた。しかし、血清中に含

まれるコバルト、ニッケル濃度は鉄や銅の濃度(約1 $\mu\text{g ml}^{-1}$)の約1/140, 約1/25であると報告されている¹⁴⁾。従って血清試料への応用には問題はない。

3・5 検量線

pH 3.5における鉄と銅、pH 8.5における鉄、銅、亜鉛について、それぞれの検量線を作成した。いずれも0.02~0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ の範囲で原点を通る直線が得られた。モル吸光係数は鉄: 1.00×10^5 (pH 3.5, pH 8.5, 582 nm), 銅: 7.60×10^4 (pH 3.5, 565 nm), 1.35×10^5 (pH 8.5, 565 nm), 亜鉛: $1.58\times 10^5\text{ l mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (pH 8.5, 565 nm)であった。同一試料5回の測定における相対標準偏差は0.46~0.80%の範囲であった。

3・6 合成試料中の3成分の定量

鉄、銅、亜鉛の3金属イオンを含む混合試料を調製しこれについて、標準操作に従って操作して565 nmにおける吸光度 A_1 , A_2 , A_3 を求めた。 A_1 は銅の含有量に対する吸光度である。又、 A_2 は銅と鉄の含量、 A_3 は鉄、銅、亜鉛の含量に対する吸光度である。そこで、pH 3.5における鉄と銅のモル吸光係数を ε_{Fe} , ε_{Cu} とし、又、pH 8.5におけるそれぞれのモル吸光係数を $\varepsilon_{2\text{Fe}}$, $\varepsilon_{2\text{Cu}}$, $\varepsilon_{2\text{Zn}}$ とすると、それぞれの金属イオンのモル濃度 c_{Fe} , c_{Cu} , c_{Zn} (mol l^{-1})は以下の式で表される。但し、 $\varepsilon_{1\text{Fe}}=\varepsilon_{2\text{Fe}}$ である。

$$c_{\text{Cu}}=A_1/\varepsilon_{1\text{Cu}}$$

$$c_{\text{Fe}}=(A_2-A_1)/\varepsilon_{1\text{Fe}}$$

$$c_{\text{Zn}}=(A_3-c_{\text{Cu}}\cdot\varepsilon_{2\text{Cu}}-c_{\text{Fe}}\cdot\varepsilon_{2\text{Fe}})/\varepsilon_{2\text{Zn}}$$

従って、それぞれの金属イオンの含有量 C_{Fe} , C_{Cu} , C_{Zn} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)を求めるには、以下の式を用いる。

$$C_{\text{Fe}}(\mu\text{g ml}^{-1})=c_{\text{Fe}}\times 55.85\times 10^3$$

$$C_{\text{Cu}}(\mu\text{g ml}^{-1})=c_{\text{Cu}}\times 63.55\times 10^3$$

$$C_{\text{Zn}}(\mu\text{g ml}^{-1})=c_{\text{Zn}}\times 65.39\times 10^3$$

Table 2にそれぞれの金属イオンのモル吸光係数を、又Table 3に3種の金属イオンを混合した合成試料について測定した結果を示す。1試料につき3回ずつ測定した。吸光度のばらつきは、サンプル1では A_1 : 0.6%, A_2 : 0.3%, A_3 : 1%であった。サンプル2については、0.5%~1.5%であった。本法はモル吸光係数及び吸光度の差を用いて金属イオン濃度を求めるため、ばらつきが大きくなることが考えられる。しかし、最もば

Table 2 Molar absorptivities of metal-nitro-PAPS complexes at 565 nm

	pH 3.5	pH 8.5
Cu complex	$\epsilon_{1\text{Cu}}$ 76000	$\epsilon_{2\text{Cu}}$ 135000
Fe complex	$\epsilon_{1\text{Fe}}$ 84500	$\epsilon_{2\text{Fe}}$ 84500
Zn complex	—	$\epsilon_{2\text{Zn}}$ 158000

Table 3 Determination of copper, iron and zinc in synthetic samples

Sample Absorbance				Concentration/ $\mu\text{g ml}^{-1}$		RSD, %
				Added	Found ^{a)}	
1	A_1	0.119	Cu	0.100	0.0995 ± 0.0006	0.6
	A_2	0.273	Fe	0.100	0.1018 ± 0.0007	0.7
	A_3	0.614	Zn	0.100	0.1030 ± 0.0021	2.0
2	A_1	0.059	Cu	0.050	0.0493 ± 0.0005	1.1
	A_2	0.134	Fe	0.050	0.0496 ± 0.0006	1.2
	A_3	0.419	Zn	0.100	0.0989 ± 0.0032	3.2

a) Mean values ± S.D. of three determinations.

らつきの大きい亜鉛においてもサンプル 1 で 2.0%, サンプル 2 で 3.2% のばらつきで濃度を求めることができた。

3・7 血清中の鉄, 銅, 亜鉛の定量

血清は以下の操作で除タンパクした後試料に供した。血清 5 ml に除タンパク剤 5 ml を加え, ガラス棒で強くかくはんする。これを沸騰水浴中に入れ 5 分間加熱した。冷却後遠心分離 (1000 g) し上澄みを採り試料とした。

除タンパクした血清試料 2 ml を 10 ml のメスフラスコに採り, 1.6 M アンモニア水 1 ml 加え, 以下標準操作に準じ操作した。結果を Table 4 に示す。定量値は ICP-AES で定量した結果とよく一致した。

文 献

- 1) R. M. Rush, J. H. Yoe: *Anal. Chem.*, **26**, 1345

Table 4 Determination of copper, iron and zinc in sera

Sample		Concentration/ $\mu\text{g ml}^{-1}$	
		This method ^{a)}	ICP-AES ^{a)}
Human 1 (purchased)	Cu	1.15 ± 0.004	1.06 ± 0.008
	Fe	0.98 ± 0.010	0.95 ± 0.014
	Zn	1.51 ± 0.029	1.60 ± 0.031
Human 2 (patient)	Cu	1.25 ± 0.010	1.20 ± 0.012
	Fe	1.05 ± 0.030	1.07 ± 0.018
Horse (purchased)	Zn	2.05 ± 0.102	2.16 ± 0.042
	Cu	0.70 ± 0.007	0.65 ± 0.032
	Fe	0.78 ± 0.031	0.78 ± 0.011
	Zn	0.45 ± 0.027	0.45 ± 0.006

a) Mean values ± S.D. of three determinations.

- (1954).
- 2) T. Sakai, N. Ohno, S. Tsurubo, M. Tanaka, M. Horigome: *Analyst* (London), **109**, 1043 (1984).
- 3) S. Tsurubo, T. Sakai: *Analyst* (London), **109**, 1397 (1984).
- 4) 古川正道, 柴田正三: ぶんせき (*Bunseki*), 1980, 330.
- 5) T. Katami, T. Hayakawa, M. Furukawa, S. Shibata, T. Hara: *Anal. Chim. Acta*, **188**, 289 (1986).
- 6) 斎藤幹彦, 堀口大吉, 喜納兼勇: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **30**, 635 (1981).
- 7) D. Horiguchi, M. Saito, T. Imamura, K. Kina: *Anal. Chim. Acta*, **151**, 457 (1983).
- 8) N. Ohno, T. Sakai: *Analyst* (London), **112**, 1127 (1987).
- 9) T. Sakai, N. Ohno: *Anal. Chim. Acta*, **214**, 271 (1988).
- 10) T. Makino, M. Saito, D. Horiguchi, K. Kina: *Clin. Chim. Acta*, **120**, 127 (1982).
- 11) T. Makino: *Clin. Chim. Acta*, **197**, 209 (1991).
- 12) Y. Hayashibe, M. Takeya, Y. Sayama: *Anal. Sci.*, **10**, 795 (1994).
- 13) S. W. Kang, T. Sakai, N. Ohno: *Anal. Chim. Acta*, **261**, 197 (1992).
- 14) 不破敬一郎: “生体と重金属”, p. 24 (1981), (丸善).

要 旨

2-(5-ニトロ-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(ニトロ-PAPS) は鉄(II), 銅, 亜鉛と水溶性のキレートを生成する。鉄キレートは 582 nm に, 銅及び亜鉛キレートはどちらも 565 nm に吸収極大を示した。キレート生成 pH は, 鉄: pH 3.4~9, 銅: 2.5~9, 亜鉛: 8~9 であった。鉄は二価のみがキレート生成し, 三価の鉄は反応しなかった。そこで, pH 3.5 で酸化剤を共存させると, 鉄と亜鉛は反応せず, 銅のみを定量することができた。又, 還元剤を添加することにより, 鉄と銅の含量が測定された。更に pH 8.5 において鉄と銅と亜鉛の 3 成分の含量が測定され, 以上の操作により, 総濃度で $0.02\sim 0.5\ \mu\text{g ml}^{-1}$ 含まれる鉄, 銅, 亜鉛の 3 金属イオンをそれぞれ分別定量することができた。本法を血清に応用し, 良好な結果が得られた。