Ethylendiamine Tetraacetic acid (EDTA)

に関する衛生学的知見補遺

第 1 報 尿中 EDTA の定量

Colorimetric Determination of EDTA in Urine

鹿児島大学医学部衛生学教室（主任 北原経太教授）

八 板 宗 哉

Muneya Yaita

Department of Hygiene, Faculty of Medicine, Kagoshima University

(Director: Prof. K. Kitahara)

I. ま え が き

1936年 R. Fick & H. Ulrich¹⁾ によって水溶性の分子内錯塩を形成する aminopolycarbon 酸の 1 つである Ethylendiamine Tetraacetic acid ((EDTA) と略称される) が合成され、その性質を応用した G. Schwarzenbach およびその協同研究者の分析化学的一連の研究²⁾ が1947年以降発表されるに及んで、EDTA は分析化学的研究だけでなく、医学の領域においてもその性質が注目を浴び、医薬品として応用されるようになった。すなわち EDTA は第1表³⁾に示すごとく多くの重金属と分子内錯塩を形成し、その錯塩は重金属の種類により固有の安定度係数が存在し、その大なるほど安定で、ある金属の EDTA 錯塩が存在する溶液に、その金属より大なる安定度係数を有する金属イオンが加えられると EDTA は安定度係数の大なる方の金属と錯塩を形成し、係数の小なる金属イオンを遊離して、錯塩中の金属イオンの交換が起る。

このような性質を利用して、産業医学の領域においては鉛中毒患者の体内鉛の排泄剤⁴⁾ として利用され、また Wilson 氏病⁵⁾ や Haemochromatosis⁶⁾ などに有効であるという報告もある。既にその製剤も市販されている。しかしながら、生体の中にはキレート化合物が存在してその生命を支配するような重要な役目を司っていることを考えると、EDTA のような強力な錯化剤が生体に加えられることは、生体内の金属酵素の作用の阻害など、生体機能への影響が考えられ、EDTA の生体内における挙動が問題になる。著者は、これらの点についての知見を得るため、本報においてはまず尿中 EDTA の

第 1 表 EDTA キレート化合物の安定度定数

Complex	Log K	Complex	Log K
(LiY) ⁻³	2.8 ^a	[Cr(OH) ₂ Y] ⁻³	10.0
(NaY) ⁻³	1.7 ^a	(MnY) ⁻²	14.0
(MgY) ⁻²	8.7	(FeY) ⁻²	14.3
(CaY) ⁻²	10.7	[Fe(OH) ₂ Y] ⁻³	9.1
(SrY) ⁻²	8.6	[Fe(OH)Y] ⁻⁴	9.8
(BaY) ⁻²	7.8	(FeY) ⁻¹	25.1
(AlY) ⁻¹	16.1	[Fe(OH)Y] ⁻²	7.5
(ScY) ⁻¹	23.1	[Fe(OH) ₂ Y] ⁻³	9.4 ^c
(YY) ⁻¹	18.1	[Fe(OH) ₃ Y] ⁻⁴	12.3 ^c
R.E.'s	g	(CoY) ⁻²	16.3
(PuY) ⁻¹	18.1	(CoY) ⁻¹	40.7 ^d
(TiY) ⁻¹	21.3 ^b	(NiY) ⁻²	18.6
(TiY) ⁰	19.4 ^b	(PdY) ⁻²	18.5 ^{b,c}
(TiOY) ⁻²	17.3	(CuY) ⁻²	18.8 ^f
(ZrY) ⁰	19.9	(AgY) ⁻³	7.3
(HfY) ⁰	19.2 ^b	(ZnY) ⁻²	16.5
(ThY) ⁰	23.2	(CdY) ⁻²	16.6
(VY) ⁻²	12.7	(HgY) ⁻²	21.8
(VY) ⁻¹	25.9	[Hg(OH)Y] ⁻³	9.1
[V(OH)Y] ⁻²	9.6	(GaY) ⁻¹	20.3
[(VO)Y] ⁻²	18.8	(InY) ⁻¹	25.0
(VO ₂ Y) ⁻³	18.1	(TiY) ⁻³	5.8 ^{b,c}
(CrY) ⁻¹	23	(PbY) ⁻²	18.0
[Cr(OH)Y] ⁻²	7.6		

温度: 20°C

イオン強度 $\mu=0.1$ MKCL または KNO₃

Y: EDTA A=オン

a μ , 0.01 M b 25°C c μ , 1.0 M

d μ , 不明 e 0.2 M HClO₄ f μ , 0.03 M

定量法について検討をおこない、さらにその排泄状況について実験をおこなった。

II. 尿中 EDTA の定量

現在 EDTA の定量には、 CaCl_2 溶液による滴定法、 MgCl_2 (あるいは $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$) による滴定法⁷⁾、ポーログラフによる方法⁸⁾、および比色法があるが、秋山らは Co^{II} の EDTA 錯塩がきわめて安定であるのでその発色を利用した方法を昭和31年春季産業衛生学会九州地方会⁹⁾において発表した。著者はこの方法の尿中 EDTA の比色定量への応用について検討をおこなった。

I) 装置および試薬

1) 装置

- 日立製作の E P B 分光光度計 (吸収曲線の作製)
- 日立製作の E P O 分光光度計 (比色定量)

2) 試薬

- 塩化コバルト溶液: $0.5\text{M CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液 (G.R)

- 過酸化水素水: 36% 溶液 (G.R)

- 緩衝溶液: 醋酸アンモン 31 g を水 200 cc に溶解し水醋酸 80 cc を加え、水で全体を 500 cc にする。

- コバルト溶液: 上記塩化コバルト溶液 200 cc を緩衝液 500 cc に加え、のち 1 l に稀釈する。

II) 実験方法および考察

1) 測定方法

a) 前処理

被検尿を定量とり、水浴上で時計皿で蓋をして10分間加温後 No. 5 A の濾紙で濾過し、混濁を除去する。

b) 比色操作

前処理をおこなった尿のうち10ccを 100cc のビーカーにとり、過酸化水素水 1.0cc、コバルト溶液 1.5cc を添加し、 100°C の水浴上で10分間加温し充分に発色せしめる。約30分放置し水を加えて30ccにして冷却後 $520\text{m}\mu$ または S 53 のフィルターを用いてその吸光度 ($-\log T$) を測り、別に作製した検量線より EDTA の量を知る。

Co^{II} -EDTA 錯塩は第1図に示すような構造の分子内錯塩で、その吸収スペクトルをみると $320\text{m}\mu$ 付近に最大吸収がみられる。

2) 検量線の作製

a) 人尿

健康人尿 110cc をビーカーにとり、 100°C の水浴上で10分間加温濾過し、各々その上澄液を10cc ずつ10本のビーカーに分け、それに EDTA 溶液 1.0cc 当り 1.0141mg

第1図 EDTA-Co 錯塩

第2図 EDTA-Co 錯塩吸収曲線 (溶媒—水)

を 1.0cc より 1.0cc 間隔で順次10cc まで漸次加え、10本の既知含有量の試料を作り、これに前述の方法により発色をおこない、その吸光度を測定した。

10~15例の人尿について、各濃度ごとの吸光度の平均値を求めて検量線を作製した。

第3図 (a) に示すごとく EDTA の Co^{II} 錯塩の吸光度は Lambert-Beer の法則に従うことがわかる。

既知濃度 (添加量) と測定値との誤差 (信頼限界95%) をみると第2表 (a) に示すごとく測定誤差は $\pm 3.2\%$ である。尿中比色定量法として充分利用できる精度であることがわかる。

b) 実験動物尿

i) 家兔尿

人尿の場合とまったく同様の方法で検量線を作製した。5例の測定誤差は $\pm 0.7\%$ である。検量線および測定値は第3図 (b)、第2表 (b) にそれぞれ示した。

ii) ラット尿

ラットの場合尿量が少ないので排泄量を10倍に稀釈し、その5ccに既知量の EDTA を加え、人尿の場合と同様の操作で検量線を作製する。7例についての測定誤

第3図(a) 人尿の場合の検量線

第3図(b) 家兎尿の場合の検量線

第3図(c) ラット尿の場合の検量線

差は $\pm 0.8\%$ である。家兎尿・ラット尿についていずれも充分比色定量に應用できる精度が得られた。

尿中 EDTA の人尿・家兎尿・ラット尿につきそれぞれの測定誤差をみると人尿は平均 $\pm 3.2\%$ で実験動物尿に比べて大である。各採尿時における被検者の個体差による尿質の変動に基づくものであると考えられる。実験動物尿は著者の実験では一定条件で飼育している関係から人尿におけるごとく変動はみられず、きわめて良好な再現率を得た。ただラットの場合尿量が少なく稀釈および採尿時の誤差が加わるので、実験動物としては家兎の方が適当である。

EDTA 定量において共存イオンの影響について安定度係数の比較的大なる Fe^{3+} のごとく金属イオンが問題になり、秋山らの報告もあるが尿の場合そのような重金属イオンの存在による影響は特殊の場合を除き無視できる。

第2表(a) 人尿における添加量と測定値

検数	添加量 mg/10cc	測定値信頼限界	測定誤差 %
15	1.0142	1.02 ± 0.08	± 7.8
14	2.0284	1.95 ± 0.11	± 5.6
15	3.0426	2.95 ± 0.12	± 4.0
13	4.0568	4.01 ± 0.08	± 1.9
15	5.0710	4.94 ± 0.12	± 2.4
13	6.0852	6.04 ± 0.13	± 2.1
13	7.0994	7.08 ± 0.19	± 2.6
10	8.1136	8.40 ± 0.17	± 2.0
11	9.1278	9.24 ± 0.20	± 2.1
11	10.1420	10.31 ± 0.20	± 1.9
信頼度 95%			平均 ± 3.2

第2表(b) 家兎尿における添加量と測定値

検数	添加量 mg/10cc	測定値信頼限界	測定誤差 %
5	29.1366	28.74 ± 0.26	± 0.9
5	48.5610	47.49 ± 0.87	± 1.8
5	67.9854	67.91 ± 0.10	± 0.1
5	87.4098	87.43 ± 0.16	± 0.1
信頼度 95%			平均 ± 0.7

第2表(c) ラット尿における添加量と測定値

検数	添加量 mg/稀釈尿 5 cc	測定値信頼限界	測定誤差 %
7	3.5154	3.62 ± 0.06	± 1.6
7	5.8590	6.005 ± 0.05	± 0.8
7	8.2026	8.39 ± 0.11	± 1.3
7	12.8898	12.92 ± 0.12	± 0.9
7	17.5770	17.06 ± 0.20	± 1.0
信頼度 95%			平均 ± 0.8

III. 尿中 EDTA の排泄

a) 投与法

i) 2,400 g 前後の ♂家兎10頭に Ca EDTA 1.0cc (9.712 mg/cc) を静脈内および腹腔内注射をした。

ii) 200 g 前後の ♂ラット7頭に Ca EDTA 1.0cc (11.718 mg/cc) を腹腔内に注射した。

b) 尿中 EDTA の定量法は前述の方法に従った。

c) 尿中排泄

家兎およびラットのいずれの場合の尿についても投与後24時間、48時間後の自然排尿によるものをそれぞれ採

第 3 表 (a)

家 兎		No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
静 脈 内	24時間	91.0%	92.3%	91.4%	93.0%	99.0%
	48時間	91.8%	92.3%	91.9%	93.1%	99.0%
腹 腔 内	24時間	99.0%	94.0%	96.0%	98.2%	96.0%
	48時間	99.0%	95.3%	96.0%	98.7%	97.1%

第 3 表 (b)

ラ ッ テ		No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7
腹 腔 内	24時間	98.2%	97.6%	95.8%	98.0%	97.9%	99.0%	96.9%
	48時間	98.7%	98.3%	97.4%	98.1%	97.9%	99.2%	99.9%

取しその一定量を採取しその排泄をみた。

家兎およびラッテにおいて尿中に排泄される EDTA は第 3 表のごとく家兎の場合静脈内投与で 93.3% (24 時間後), 93.6% (48 時間後), 腹腔内投与で 96.6% (24 時間後), 97.2% (48 時間後), ラッテでは腹腔内投与のみであったが 97.6% (24 時間後), 98.5% (48 時間後) という成績になり 2~7% は体内に残ることになるが, 糞便中に排泄されるのを考慮に入れても 1~2% 程度は体内に残るのではないかと思われその運命については不明である。

Ca EDTA の代謝について H. Foremans¹⁰⁾ は Ca C¹⁴-EDTA を用いた実験で腹腔内注射の場合 6 時間後で 95~98% が尿中に排泄されることを報告している。また経口投与については 2~18% (多くは 2~4%) の体内の吸収をみている。EDTA の投与から排泄されるまでの過程および体内に残ったものの生体に及ぼす影響については実験中であるので, これについては後報で述べる予定である。

IV. む す び

- 1) 尿中 EDTA の定量法として Co⁵⁸-EDTA 錯塩

の生成による発色 (最大吸収 520m μ) を利用する方法について検討した。人尿について測定の実差 $\pm 3.2\%$, 家兎尿 $\pm 0.7\%$, ラッテ尿 $\pm 0.8\%$ (いずれも信頼度 95%) の精度で定量可能である。

2) 家兎を用いた実験において Ca EDTA の尿中排泄は腹腔内投与で 96.6% が 24 時間後に, 97.2% が 48 時間後に排泄される。静注の場合 24 時間後 93.3%, 48 時間後 93.6% であった。

本文の要旨は第 30 回日本産業医学会 (昭和 32 年 7 月札幌市) において発表した。

擧筆するに当り終始御指導ならびに御校閲をいただいた恩師北原教授および実験について種々御教示を得た秋山助教授に厚く謝意を表する。

文 献

- 1) R. Fick & Ulrich: Ger, 638, 071, 1936.
妻木: 錯化合物, 1956, 岩波書店。
- 2) 例えば G. Schwarzenbach u. Ackermann: Helv. chim. Acta, **31**, 1029, 1948.
上野: 化学の領域, **5**, 481, 1951.
- 3) J. Bjerrum, G. Schwarzenbach & L. G. Silen: "Stability Constants of Metal-ion Complexes" Part 1: "Organic Ligands", Chem. Soc., London, 1957, Special Publ. No. 6.
- 4) 例えば織田実男: 国民衛生, **25**, 22~55, 1956.
- 5) Bickel: Quart. J. Med., **26**, 527, 1957.
医学のあゆみ, **27**, 207, 1958.
- 6) Wishinsky, H., Weinberg, T., Prévost, E. M., Burgin, B. & Miller, M. J.: J. Lab. & Med., **42**, 550, 1953.
- 7) Kerkow, Z.: Anal. Chem., **133**, 281, 1951.
上野: 化学の領域, **6**, 670~676, 1952.
- 8) Furness, Grawshaw, Davis: Analyst, **74**, 629, 1949.
上野: 化学の領域, **6**, 670~676, 1952.
- 9) 秋山・脇元: 労働科学, **32**, 962, 1956.
- 10) Foreman, H., Vier, M. & Magee, M.: J. Biol. Chemistry, **203**, 1045~1053, 1953.

(受付: 1958 年 12 月 5 日, 特別掲載)