Octabromo-tetrakis(4-methylpyridyl) porphine を用いる銅イオンの吸光光度定量

御船正樹,^{*,a} 岩藤章正,^a 神野伸一郎,^b 榎本秀一^{a,b}Photometric Determination of Cu²⁺ Ion Using Octabromo-tetrakis(4-methylpyridyl) porphineMasaki Mifune,^{*,a} Akimasa Iwado,^a Sinichiro Kamino,^b and Shuichi Enomoto^{a,b}^aDivision of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Medicine and Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University; Tsushima-Naka, Kita-ku, Okayama 700-8530, Japan; and^bMultiple Molecular Imaging Research Laboratory, RIKEN Kobe Institute; 6-7-3 Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe 650-0047, Japan.

(Received March 22, 2012; Accepted May 8, 2012)

Octabromo-tetrakis(4-methylpyridyl) porphine (OBTMPyP), an octabromonated compound with 4 pyrrole rings of tetrakis(4-methylpyridyl) porphine, selectively forms a complex with Cu²⁺ ions at pH 2.0. When 3.6×10^{-5} mol/L OBTMPyP was added to the reaction mixture, the calibration curve showed good linearity for Cu²⁺ ions ranging from 0.01–2.2 μ g (addition of 1.0 mL). A good coefficient of variation (Cu²⁺ ions = 1.5 μ g (addition of 1.0 mL), $n=10$, 0.8 %) was obtained. The molar absorption coefficient (ϵ) based on Cu²⁺ ions was 8.5×10^4 L/mol·cm. This value was 6-fold greater than that determined with a clinical chemical analysis kit using the bathocuproine sulfonic acid method, which is a well-known method for spectrophotometric determination of the Cu²⁺ ion concentration. A deproteinization method was successfully applied in the clinical analysis kit for determination of Cu²⁺ ion concentrations in control serum I, and the values determined using this method and the bathocuproine sulfonic acid method were almost the same.

Key words—octabromo-tetrakis(4-methylpyridyl) porphine; Cu²⁺ ion; photometric determination

緒 言

Tetrakis(sulfophenyl) porphine (TMPyP) のような水溶性ポルフィリンは、大きなモル吸光係数 (10^5 台) を持ち、様々な金属イオンと錯体を生成することより、金属イオンの超高感度吸光光度分析試薬として注目されてきた。^{1–11)} しかし、金属イオンとポルフィリンの錯体生成は常温では容易に進行しないため、加熱や余分な試薬の添加が必要であった。近年、ポルフィリンのピロール環を臭素化した八臭素化ポルフィリンが、金属イオンとの反応性のよさから注目されている。^{12–15)}

先に tetrakis(4-methylpyridyl) porphine のピロール環を八臭素化した octabromo-tetrakis(4-methylpyridyl) porphine (OBTMPyP, Fig. 1) が pH 3.0 以上の常温で様々な金属イオンと錯体を容易に生成す

ることを報告した。¹⁶⁾ その際、金属 OBTMPyP の Soret 帯の吸収極大波長は、錯体生成により、様々な変化するため、OBTMPyP は金属イオンの吸光光度定量試薬として利用できる可能性のあることも

X=H : Tetrakis(4-methylpyridyl)porphine (TMPyP)
X=Br : Octabromo-TMPyP (OBTMPyP)

Fig. 1. Structures of TMPyP and OBTMPyP

The authors declare no conflict of interest.

^a岡山大学大学院医歯薬学総合研究科(薬学系), ^b理化学研究所神戸研究所分子イメージング研究センター

*e-mail: mifune@pharm.okayama-u.ac.jp

報告した。さらに、pH 2.0 では、反応速度は遅くなるが OBTMPyP は銅イオンと反応し Cu-OBTMPyP を生成することを見出した。これは、前回検討した他の金属イオンでは観測されなかった銅イオンに特異的な反応である。一方、生体内で銅イオンは、主に酸化還元酵素の重要な構成成分として知られている。したがって、血清銅の定量は、様々な疾病の診断や検査やステロイド剤の投与管理などで重要である。しかし、臨床化学検査で繁用されている吸光光度法は、感度面や精度面で問題が多い。そこで、本研究では、pH のコントロールだけで達成できる OBTMPyP を用いる銅イオンの吸光光度定量法の開発を目的とした。

実 験

1. Octabromo-5,10,15,20-tetrakis (4-methylpyridyl) porphine の調製 前報同様,¹⁶⁾ Richard らの方法¹³⁾ に従い、市販の tetrakis (4-methylpyridyl) -porphine (TMPyP) を用い、まず、銅錯体である Cu-TMPyP を調製し、それを臭素化して調製し、過塩素酸を用いて脱金属操作を行い調製した。

なお、OBTMPyP の $\lambda_{\max}$ やモル吸光係数は文献値と一致した。¹³⁾

2. 金属標準液 以下の原子吸光用標準液（和光純薬工業株式会社製）を用いた。

銅標準液；1006 mg/L Cu^{2+} (as $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$)
in 0.1 mol/L HNO_3

亜鉛標準液；1004 mg/L Zn^{2+} (as $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$)
in 0.1 mol/L HNO_3

コバルト標準液；1003 mg/L Co^{2+} (as $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$)
in 0.1 mol/L HNO_3

マンガン標準液；1004 mg/L Mn^{2+} (as $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$)
in 0.1 mol/L HNO_3

ニッケル標準液；1002 mg/L Ni^{2+} (as $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$)
in 0.1 mol/L HNO_3

鉄標準液；1006 mg/L Fe^{3+} (as $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$)
in 0.1 mol/L HNO_3

その他の金属イオンは、主に試薬特級の塩化物を用いた。

3. 緩衝液 緩衝液として、それぞれ、pH 2.0 は、酢酸ナトリウム (1 mol/L)–塩酸 (1 mol/L) 緩衝液を、pH 4.0–6.0 は、酢酸 (0.1 mol/L)–酢酸ナトリウム (0.1 mol/L) 緩衝液を、pH 7.0 及び

7.5 は、リン酸水素二ナトリウム (0.01 mol/L)–リン酸二水素カリウム (0.01 mol/L) 緩衝液を、pH 7.5–10.0 は、ホウ酸ナトリウム (0.05 mol/L)–ホウ酸 (0.2 mol/L, 塩化ナトリウム (0.05 mol/L) 含む) 緩衝液を用いた。なお、これらの緩衝液の調製には、試薬特級品又は一級品を用いた。また、他の試薬は、特級品又は一級品を用いた。

4. その他の試薬 バソクプロイン法による臨床化学用血清銅定量用キットとして Cu テストワコー（和光純薬）を用いた。その他の試薬は、試薬特級品又は一級品を用いた。

5. 装置 吸光度及び吸収スペクトルの測定には、日本分光工業（株）製 JESCO V-570 型 UV-VIS-NIR 分光光度計と 1.0 cm 石英セルを用いた。pH の測定には、堀場製作所製カスターニー ACT D-21 型 pH メーターを用いた。

6. OBTMPyP を用いる銅イオンの定量操作
 3.6×10^{-5} mol/L OBTMPyP 溶液 ($f=1.06$, $f=$ モル濃度係数) 1.0 mL と酢酸ナトリウム–塩酸緩衝液 (pH 2.0, 3.0 mL) の混液に銅イオン溶液 (1.0 mL) を加え 40°C で 30 分間放置後、400–600 nm の吸収スペクトルを測定し、457 nm の吸光度を求め、検量線より銅イオン濃度を求めた。

7. 市販臨床化学分析用バソクプロイン法 Kit による血清銅イオンの定量操作 ここで、市販臨床化学分析用バソクプロイン法 Kit として、和光純薬製 Cu テストワコーを用いた。

その概略は、標準血清 2.0 mL に 0.14 mol/L 塩酸ヒドロキシルアミンの 0.81 mol/L HCl 溶液 2.0 mL を加え 80–95°C で 2 分間加熱した後、0.73 mol/L のトリクロロ酢酸 1.0 mL を添加し、2000 rpm で 15 分間遠心させ、除タンパク操作を行い、その上澄液 3.0 mL に 0.52 mol/L バソクプロインナトリウムの 0.75 mol/L 酢酸ナトリウム溶液 1.0 mL を加え、10 分間室温で反応させ、480 nm の吸光度を測定し、試薬ブランクの吸光度との比較より、銅イオン濃度を求めるというものである。

8. OBTMPyP を用いる血清銅イオンの定量操作
上記、バソクプロイン法による除タンパク操作を行い、得られた上澄液 1.0 mL に 1.0 mol/L NaOH 0.5 mL を加え、pH が 2.0 になるように調製し、そのまま、試料として、上記 OBTMPyP を用いる方法に適用した。

結果及び考察

1. OBTMPyP を用いる銅イオンの定量条件の検討 この項の検討には、 3.6×10^{-5} mol/L OBTMPyP 溶液と緩衝液の 1 : 3 の混液 4.0 mL に銅イオン溶液（主に $3.0 \mu\text{g/mL}$, 4.73×10^{-5} mol/L）1.0 mL を添加して行った。

1-1. pH の影響 Richard らにより、Cu-OBTMPyP, $\text{H}_2\text{-OBTMPyP}$ (pH 8.0) 及び $\text{H}_3\text{-OBTMPyP}$ (pH 2.0) の Soret 帯の λ_{max} は、それぞれ、457 nm, 540 nm 及び 501 nm であると明らかにされている。¹³⁾ したがって、銅イオンの定量には、互いの Soret 帯の λ_{max} が離れた Cu-OBTMPyP 及び $\text{H}_2\text{-OBTMPyP}$ (pH 8.0) を用いた方がよいと思われる。そこで、まず、 $3.0 \mu\text{g/mL}$ の Cu^{2+} イオン 1.0 mL を用いて Cu-OBTMPyP の生成に及ぼす pH の影響を検討した。その結果を吸収スペクトルとして Fig. 2 に示した。Figure 2 に示すように pH 3.0 以上では、室温で、OBTMPyP のモル数以上の銅イオン溶液を加えると 1 分以内に、Soret 帯は、458 nm にシフトした。これは、Cu-OBTMPyP の生成によるものである。また、pH 2.0 においても、反応時間 10 分では、完全に反応は終了していないが、Cu-OBTMPyP の生成が観測された。通常、ブロム化されていない Tetrakis (4-methylpyridyl) porphine (TMPyP) の場合、酸性状態では、銅イオンと反応しないことを考慮すると、これは、OBTMPyP の歪んだポルフィリン環により銅

Fig. 2. Absorption Spectra of OBTMPyP in Various Buffers at pH 2.0, 5.0, and 8.0

1.0 mL of 3.6×10^{-5} mol/L OBTMPyP solution ($f=1.06$) and 4.0 mL of Buffer.

イオンとの反応性が向上したためであると考えられる。^{12,15)}

未反応の $\text{H}_n\text{-OBTMPyP}$ が残存していたとき、pH 5.0 以下では、Soret 帯は 500 nm ($\text{H}_2\text{-OBTMPyP}$) に、pH 8.0 以上では、540 nm ($\text{H}_2\text{-OBTMPyP}$) に観測される。pH 8.0 で他の金属イオンを銅イオンと共存させて吸収スペクトルを測定した。

1-2. 他の金属イオンの影響 まず、pH 8.0 で他の金属イオンを銅イオンと共存させて吸収スペクトルを測定した。なお、この検討では、銅イオン ($1 \mu\text{g/mL}$) 及びその他の金属イオン ($1 \mu\text{g/mL}$) の 1 : 1 混液 1.0 mL と緩衝液 3.0 mL を用いた。その結果を Fig. 3 に示す。Figure 3 から明らかなように、 Cu^{2+} イオンと同様に他の金属イオンも $\text{H}_2\text{-OBTMPyP}$ と反応して、2 種の金属-OBTMPyP の吸収スペクトルと過剰の $\text{H}_2\text{-OBTMPyP}$ の吸収スペクトルの混じったスペクトルを示し、銅イオンのみの定量に用いるには不向きなことがわかった。そこで、pH 2.0 で $\text{H}_3\text{-OBTMPyP}$ 溶液に様々な $2.0 \mu\text{g/mL}$ 金属イオン溶液 1.0 mL を添加したときの吸収スペクトルを検討した結果 (Fig. 4), 銅イオンを添加したときのみ Soret 帯の 457 nm へのシフトが観測され、他の金属イオンを添加しても Ni^{2+} イオンを除き、 $\text{H}_3\text{-OBTMPyP}$ のスペクトルにほとんど変化はなく、pH 2.0 では、他の金属イオンと $\text{H}_3\text{-OBTMPyP}$ とは反応しないことがわかった。 Ni^{2+}

Fig. 3. Effect of Foreign Metal Ions on the Formation of Cu-OBTMPyP at pH 8.0

1.0 mL of 3.6×10^{-5} mol/L OBTMPyP solution ($f=1.06$), 3.0 mL of 0.05 mol/L borate buffer (pH 8.0), OBTMPyP: 1.0 mL of H_2O , $+\text{Cu}^{2+}$: 0.5 mL of $3.0 \mu\text{g/mL}$ Cu^{2+} ion solution, and 0.5 mL of H_2O , $+\text{Cu}^{2+} \& \text{Zn}^{2+}$: a 1 : 1 mixture of $3.0 \mu\text{g/mL}$ Cu^{2+} ion solution, and $3.0 \mu\text{g/mL}$ Zn^{2+} ion solution (1.0 mL), $+\text{Cu}^{2+} \& \text{Mn}^{2+}$: a 1 : 1 mixture of $3.0 \mu\text{g/mL}$ Cu^{2+} ion solution and of $3.0 \mu\text{g/mL}$ Mn^{2+} ion solution (1.0 mL), $+\text{Cu}^{2+} \& \text{Co}^{2+}$: a 1 : 1 mixture of $3.0 \mu\text{g/mL}$ Cu^{2+} ion solution, and of $3.0 \mu\text{g/mL}$ Co^{2+} ion solution (1.0 mL). Reaction temperature and time: room temperature, 10 min.

イオンによる吸収スペクトルの変化もわずかであり、銅イオンの定量に大きな影響を及ぼさないものと考えられる。したがって、以下の検討は、pH 2.0で行うことにした。なお、以下、H_n-OBTMPyPをOBTMPyPとして表すことにする。

1-3. pH 3.0 以下での検討 OBTMPyPとCu²⁺イオンの反応をpH 3.0以下の領域でも検討した。その結果をFig. 5に示した。Figure 5に示すように、pH 1.0でもpH 2.0のときの約93%のCu-OBTMPyPが生成していることがわかった。さらに、反応時間を延ばせば、100% Cu-OBTMPyPに移行すると考えられる。また、pH 3.0では、10分の反応時間で反応は終了し、以降487 nmの吸光度

Fig. 4. Effect of Various Metal Ions on the Absorption Spectra of OBTMPyP at pH 2.0

1.0 mL of 3.6×10^{-5} mol/L OBTMPyP solution ($f=1.06$), 3.0 mL of 0.1 mol/L CH₃COONa-HCl buffer (pH 2.0) and 1.0 mL of 3.0 μ g/mL metal ion solution or H₂O. Reaction temperature and time: 40°C, 30 min.

は同じ値を示した。しかし、ここには示していないが、pH 3.0ではZn²⁺イオンがOBTMPyPと反応するようになった。そこで、反応時間と他の金属イオンの妨害を考えてpH 2.0を用いることにした。

1-4. 反応時間と反応温度の影響 反応時間及び反応温度の影響を検討した結果を、それぞれ、Fig. 6に示した。なお、いずれも縦軸は、Cu-OBTMPyPの487 nmにおける吸光度である。Figure 6 (A)に示すように20分以上インキュベートすれば、ほぼ、一定の吸光度が得られることがわかった。さらに、反応温度は、Fig. 6(B)に示すように40°C以上であれば、30分で吸光度が一定となることがわかり、40°Cとした。

Fig. 5. Effect of Low pH Using Various Buffers

1.0 mL of 3.6×10^{-5} mol/L OBTMPyP solution ($f=1.06$), 1.0 mL of 3.0 μ g/mL Cu²⁺ ion solution and 3.0 mL of buffer. Reaction temperature and time: 40°C, 30 min.

Fig. 6. Effect of Reaction Times and Temperatures

(A) 1.0 mL of 3.6×10^{-5} mol/L OBTMPyP solution ($f=1.06$), 3.0 mL of 0.1 mol/L CH₃COONa-HCl buffer and 1.0 mL of 3.0 μ g/mL Cu²⁺ ion solution. Reaction temperature: 40°C. (B) 1.0 mL of 3.6×10^{-5} mol/L OBTMPyP solution ($f=1.06$), 3.0 mL of 0.1 mol/L CH₃COONa-HCl buffer and 1.0 mL of 3.0 μ g/mL Cu²⁺ ion solution. Reaction time: 30 min.

2. 共存イオンの影響 Cu-OBTMPyP の生成に対する他金属イオンの影響について, 2.0 $\mu\text{g/mL}$ Cu^{2+} 溶液 0.5 mL と 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 共存金属イオン溶液 0.5 mL と, Buffer (pH 2.0) 3.0 mL とを混合したものに, 3.6×10^{-5} M OBTMPyP 溶液 ($f=1.06$) 1.0 mL を加え, 40°C で 30 分放置後に各々紫外・可視分光光度計を用いて測定した. そして, 各金属イオンの 457 nm における吸光度と, 銅イオンのみを OBTMPyP に反応させたときの 457 nm における吸光度とを比較して, 各々における誤差率を Table 1 に示す式から求め Table 1 に示した. Table 1 に示すように, 1.0 $\mu\text{g/mL}$ の共存イオンは, 金属イオンを含め, Cu^{2+} イオンの定量をほとんど妨害しないことがわかった. したがって, これらのイオンが Cu-OBTMPyP の生成に与える影響は小さいと考えられる.

3. 銅イオンに対する検量線 0.5–3.0 $\mu\text{g/mL}$ までの Cu^{2+} イオンを添加した際の吸収スペクトルを Fig. 7 に示した. Figure 7 に示すように, Cu^{2+} イオンの濃度が増加するにつれ, 457 nm の吸光度が上昇し, 500 nm の吸光度が減少しているのがわかる. 457 nm の吸光度変化より Cu^{2+} イオンの検量線を作成すると, ここには示していないが 0.1–2.5 $\mu\text{g/mL}$ の Cu^{2+} イオンに対し, 良好な直線性を持つ検量線を得ることできた.

この検量線より, この方法における Cu^{2+} イオンに対するモル吸光係数を求めると $\varepsilon=9.0 \times 10^4 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}^{-1}$ となった. なお, 先の pH 9.0 を用いた

検討では Cu^{2+} イオンに対するモル吸光係数を求めると $\varepsilon=9.1 \times 10^4 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}^{-1}$ となり,¹⁶⁾ Cu^{2+} イオンに対するモル吸光係数は, pH 2.0 と 9.0 で大きな差のないことがわかった. また, この値は, 後述する既存法のバソクプロイン法 ($\varepsilon=1.2 \times 10^4 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}^{-1}$) に比べ, 約 6 倍高感度であった. さらに, 銅イオンに対する結合定数 K_a は, $K_a=2.6 \times 10^5 (\text{dm}^3/\text{mol})$ となった.

1.5 $\mu\text{g/mL}$ の Cu^{2+} イオンに対する変動係数 ($n=10$) は, 0.8% と良好であった. これは, 併行精度に相当する. また, 室内再現精度は 1.0% ($n=$

Fig. 7. Changing the Absorption Spectra of $\text{H}_2\text{-OBTMPyP}$ to Determine the Calibration Curve by Adding Various Concentrations of Cu^{2+} Ions

1.0 mL of 3.6×10^{-5} mol/L $\text{H}_2\text{-OBTMPyP}$ ($f=1.06$), 3.0 mL of 0.1 mol/L $\text{CH}_3\text{COONa-HCl}$ buffer (pH 2.0), and 1.0 mL of 0.5–3.0 $\mu\text{g/mL}$ Cu^{2+} ion solution. Reaction temperature and time: 40°C , 30 min.

Table 1. Effect of Foreign Metal Ions

Foreign ion	Amount ($\mu\text{g/mL}$)	Error (%) [*]	Foreign ion	Amount ($\mu\text{g/mL}$)	Error (%) [*]
Na^+	1	0.9	Cl^-	1	1.3
K^+	1	2.0	Br^-	1	1.3
Mg^{2+}	1	1.4	F^-	1	1.7
Zn^{2+}	1	3.0	I^-	1	1.81
Ni^{2+}	1	0.1	NO_3^-	1	1.1
Fe^{3+}	1	2.2	SO_4^{2-}	1	0.8
Mn^{2+}	1	0.9			
Co^{2+}	1	1.4			

$\text{Cu}^{2+}=1.0 \mu\text{g/mL}$ added.

Absorbance was measured at 457 nm against water.

^{*} Error (%) = $\frac{\text{Absorbance}(\text{each ion} + \text{Cu}^{2+} \text{ ion}) - \text{Absorbance}(\text{Cu}^{2+} \text{ ion})}{\text{Absorbance}(\text{Cu}^{2+} \text{ ion})} \times 100$

Absorbance (each ion + Cu^{2+} ion): 1.0 mL of 3.6×10^{-5} mol/L OBTMPyP solution ($f=1.06$), 3.0 mL of 0.1 mol/L $\text{CH}_3\text{COONa-HCl}$ buffer (pH 2.0) and 1.0 mL of 1 : 1 mixture of 2.0 $\mu\text{g/mL}$ Cu^{2+} ion and 2.0 $\mu\text{g/mL}$ foreign ion solution. Absorbance (Cu^{2+} ion): 1.0 mL of 3.6×10^{-5} mol/L OBTMPyP solution ($f=1.06$), 3.0 mL of 0.1 mol/L $\text{CH}_3\text{COONa-HCl}$ buffer (pH 2.0) and 1.0 mL of a 1 : 1 mixture of 2.0 $\mu\text{g/mL}$ Cu^{2+} ion solution and H_2O . Reaction temperature and time: 40°C , 30 min.

Table 2. Determination of Cu^{2+} Concentrations in Control Serum I by Bathocuproine Method and OBTMPyP Method

	Cu^{2+} concentration ($n=10$)	Relative S.D. (%)
Bathocuproine method	129.5 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$	4.26%
OBTMPyP method	116.7 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$	4.73%

10), 室間再現精度は 1.2% ($n=5$) と良好であった。

また, 先の報告により $\text{H}_2\text{-OBTMPyP}$ と Cu^{2+} ion はモル比 1:1 で反応していることがわかっている。¹⁶⁾

さらに, データは示さないが, 2 倍濃度の $\text{H}_2\text{-OBTMPyP}$ を使用すれば, 上限, 約 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の, 1/2 濃度の $\text{H}_2\text{-OBTMPyP}$ を用いれば, 下限, 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Cu^{2+} イオンまで定量可能であった。

4. 血清銅の定量 バソクプロイン法の除タンパク操作と組み合わせて本法による標準血清中の血清銅の定量を試みた。

標準血清 2.0 mL に 0.14 mol/L 塩酸ヒドロキシルアミンの 0.81 mol/L HCl 溶液 2.0 mL を加え 80–95°C で 2 分間加熱した後, 0.73 mol/L のトリクロロ酢酸 1.0 mL を添加し, 2000 rpm で 15 分間遠心させ, 上清 1.0 mL に対して 1.0 mol/L NaOH 溶液を 0.5 mL 加え, 溶液の pH を 2.0 に調整し, その 1.0 mL を試料として用いた。

その結果を, バソクプロイン法を用いて求めた値とともに Table 2 に示した。

Table 2 に示したように, 両方で求めた値は, 互いによく似ており, 本法は, 血清銅の定量にも応用できる可能性のあることがわかった。

結 論

今回開発した方法は, pH=2.0 で反応させるだけという pH コントロールのみで銅イオンのみ OBTMPyP と反応させることができた。感度的には他のブロム化されていないポルフィリンを用いる方法に比べ劣るが, 臨床検査などで汎用されているバソクプロイン法に比べ, 6 倍以上の感度があり, 血清銅の定量にも利用できることがわかった。今後, 臨

床分析等への利用が期待できるものと考えられる。

謝辞 この実験の一部は, 科学研究費補助金 (基盤研究 (C) 課題番号 20590035) により行われた。

REFERENCES

- 1) Itoh J., Yotsuyanagi T., Aomura K., *Anal. Chim. Acta*, **74**, 53–60 (1975).
- 2) Ishii H., Koh H., *Talanta*, **24**, 417–420 (1977).
- 3) Watanabe H., Ohmori H., *Talanta*, **28**, 774–776 (1981).
- 4) Makino T., Itoh J., *Clin. Chim. Acta*, **111**, 1–8 (1981).
- 5) Ishii H., Koh H., Satoh K., *Anal. Chim. Acta*, **136**, 347–352 (1982).
- 6) Tabata M., Tanaka M., *Mikrochim. Acta*, **2**, 149–158 (1982).
- 7) Ishii H., Satoh K., Satoh Y., Koh H., *Talanta*, **29**, 545–550 (1982).
- 8) Tabata M., Kaneko K., *Analyst*, **112**, 141–144 (1987).
- 9) Komata M., Itoh J., *Talanta*, **35**, 723–724 (1988).
- 10) Kilian K., Pyrzyńska K., *Talanta*, **60**, 669–679 (2003).
- 11) Bellacchio E., Lauceri R., Magri A., Purrello R., Gurrieri S., Scolaro L. M., Romeo A., *Chem. Commun.*, 1333–1334 (1998).
- 12) Tabata M., Nishimoto J., Kusano T., *Talanta*, **46**, 703–709 (1998).
- 13) Richards R. A., Hammons K., Joe M., Miskelly G. M., *Inorg. Chem.*, **35**, 1940–1944 (1996).
- 14) Haberle I. N., Liochev S. I., Spasojević I., Fridovich I., *Arch. Biochem. Biophys.*, **343**, 225–233 (1997).
- 15) Kawamura-Konishi Y., Hosomi N., Neya S., Sugano T. S., Funasaki N., Suzuki H., *J. Biochem.*, **119**, 857–862 (1996).
- 16) Mifune M., Iwado A., Taniguchi M., Kamino S., Enomoto S., *Yakugaku Zasshi*, **131**, 1233–1240 (2011).