

生体組織中微量金属測定における試料前処理法の改良に関する検討

野 本 昭 三*
佐 藤 守 俊**

1 はじめに

従来、生体試料中の微量金属の測定操作には、試料の灰化、キレート化合物の化成、抽出と濃縮等の前処理操作を経て、原子吸光分析にかけるのが一般的な方法とされてきた。しかも、組織中の金属含量はその金属種によって大きく異なることや、また、抽出過程で金属間に干渉があることなどもあって、ひとつの前処理操作で組織中にあるすべての金属測定をカバーすることは困難とされてきている^{1)~7)}。

我々は、各種の動物組織中の重金属を測定して、環境化学的観点からこれを解析する研究計画を立てたが、これの実施にあたって、能率的かつ正確な試料の前処理法および測定法を開発する必要に迫られ、検討の末、ヒ素、カドミウム、クロム、マンガン、ニッケル、鉛などの金属についてはほぼ目的に添う単一前処理法および測定法を確立することができた。

なお、本検討の実実施計画を立てるにあたっては、次にあげる2つの点を検討の要点として行なった。即ち、1) 簡単な、しかも単一の試料前処理操作（第一次前処理過程）により多種類の金属の測定を可能にすること。2) フレームレス原子吸光分析法における電気炉（グラファイトファーネス）内の反応、即ち、乾燥、灰化、そして原子化後（フラッシュ）の過程も総合して一種の前処理過程（第二次前処理過程）として考え、その至適条件の選定により、第一次前処理過程の不備を補うこと、の2点である。

2 方 法

1) 試 薬

各金属の標準液は、市販の原子吸光用標準液を、硫酸、硝酸、過塩素酸は有害金属測定用を、過酸化水素は精密分析用を、その他の試薬は特級（以上すべて和光純薬製）を用い、水はイオン交換再蒸留水を使用した。鉛の分析に際して炉内添加に用いた硝酸ニッケルは、金属ニッケル1.0gを希硝酸に溶解し、水浴上で2時間ほど加熱した後、水で100mlとし必要に応じて水で希釈した。

* 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科

** 信州大学医学部公衆衛生学教室

2) 装 置

日立 170-50 型原子吸光度計に、パーキンエルマー HGA-2200 型グラファイトファーネスアトマイザーとオートサンプラー AS-1 を付けたものを用いた。また、グラファイトチューブはパーキンエルマーの 091-504 (パイロ化)、070-699 (無パイロ化) を用いた。試料の灰化には、サイニックス社のドライバス AL-1000 を改良 (ブロックの深さを 100mm に) したものをを用いた。

3) 生体試料の前処理法

a 試料の採取：試料の 0.5~1g をプラスチック製ナイフで組織深部より切り出し、重量既知の Pyrex 試験管 (150×15mm, 15mL) に採取、秤量し、試料の 2.5 倍量の硝酸を加え、室温に一夜置き、翌朝、単純溶解法または完全灰化法に移った。

b 単純溶解法：試料が溶解し透明になるまで加熱し (110~115°C, 6~12時間)、冷却後、水で組織重量の約 5 倍になるよう希釈し、再び秤量して希釈率を求めた。必要に応じて更に希釈をする場合もすべて重量法で行なった。

c 完全灰化法：試料を加熱溶解し、液量が 1/3 ほどになるまで (約 115°C, 3時間) 加熱を続けた後、放冷し、硫酸 0.2mL、過塩素酸 0.1mL、硝酸 0.5mL を加えて再び加熱し (130°C, 約 2時間)、最後に 250~300°C に温度を上昇させて、液が無色透明 (灰化完了) であることを確かめ、もしこの際、褐色または黒色を呈したら、放冷して硝酸 0.2mL を追加し、130°C で 30 分加熱してから、再度高温加熱で灰化完了を確かめた。

4) 原子吸光測定に関する基礎的事項の検討

a 基本的な原子化温度：各金属について、吸光度 0.3 程度を示す濃度に調整した標準液を用い、金属別に原子化温度を 1000°C から 2700°C まで 100~200°C 間隔で段階的に上昇させながら原子吸光度を測定した。なお原子化時の炉内ガスフローはすべて 50 mL/min at initial 3min. でおこなった。なお、この実験での灰化温度は、鉛、カドミウム、ヒ素は 400°C、その他は 800°C を用いた。

b 基本的な耐灰温度 (耐灰温度：目的金属を失なうことなく加熱できる最高温度)：原子化温度の検討と同じ標準液を用い、灰化温度を 200°C から 100~200°C ずつ上昇させながら、各金属の原子吸光度を測定した。

なお、この実験での原子化温度は、実験4)の a によって得られた至適温度を用いた。

c 各種金属の原子吸光度に及ぼす硝酸の影響：各金属標準液に硝酸を 0.001 mol/L から 3 mol/L になるよう添加した試料を作り、無パイロ化グラファイトチューブとパイロ化グラファイトチューブの 2 種を用いて、それぞれ実験4)の a, b で得られた至適条件で吸光度を測定し比較した。

d 単純溶解処理後に試料中に残存する硝酸量：単純溶解法による試料液中の硝酸濃度を BTB 指示薬を用い、0.1N 水酸化ナトリウム溶液で滴定し求めた。

e matrix 添加による耐灰化温度の改善 (ヒ素に対するマグネシウムおよびニッケルの効果と、鉛に対するニッケルの効果)：ヒ素については、硝酸マグネシウム水溶液 (Mg 100mg/L) または硝酸ニッケル水溶液 (Ni 1000mg/L) をヒ素の標準液 (0.5mg/L) と同量炉

内に添加して、耐灰化温度の変化について検討した。鉛については、100mg/l, 1000mg/l, 10000mg/l の三種の硝酸ニッケル水溶液を作り、ヒ素の場合と同様の炉内添加を鉛の標準液と、牛肝組織の単純溶解試料について実施して、それぞれ耐灰化温度の変化を検討した。

f 共存塩類の干渉：塩化ナトリウム濃度が0.15%になるよう水、0.1M 硝酸、単純溶解試料に添加したものについて、D₂ランプを光源にした原子化時のバックグラウンドシグナル（以下BGと略）の大きさを190nmから300nmの間で10~20nm間隔で波長を変えながら記録した。但し、原子化温度には2000°Cを用いた。

また、0.01mMから1Mまでの各種濃度の硝酸溶液に塩化ナトリウムを0.15%になるよう添加して、それぞれのBGの大きさを235nmにおいて測定した。

g 異なる2つの前処理法（単純溶解法と完全灰化法）で処理した試料の原子化時のBGの比較：単純溶解法と完全灰化法で前処理した試料を、灰化温度を400°Cから100~200°Cずつ上げながら原子化時のBGの変化を測定した。

h 動物組織における単純溶解法と完全灰化法の比較：主として肝組織を用いて、まず、各金属別にそれぞれの前処理法に応じた至適条件を選定した上で、測定感度、直線性、回収試験、再現性について比較した。

3 結果

原子吸光測定に関する基礎的事項の検討結果

a 基本的な原子化温度は、図-1に示すように、鉛、カドミウムは2100~2300°C、マンガンは2500°C、ヒ素、クロム、ニッケルは2700°Cにおいてそれぞれもっとも高感

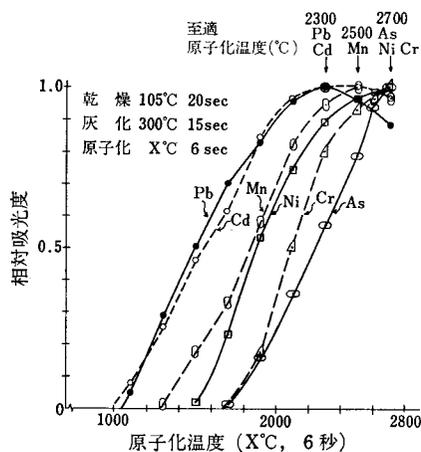


図1 各種金属における原子化温度と原子吸光度の関係（各種金属別至適原子化温度）
 グラファイトチューブ：表1と同じ

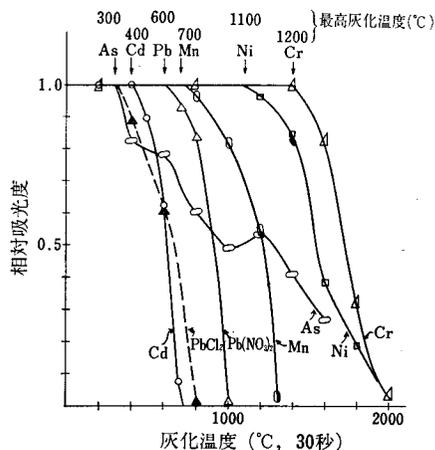


図2 各種金属における灰化温度と原子吸光度の関係（各種金属別至適灰化温度）
 原子化温度：図1の各金属の至適原子化温度
 グラファイトチューブ：表1と同じ

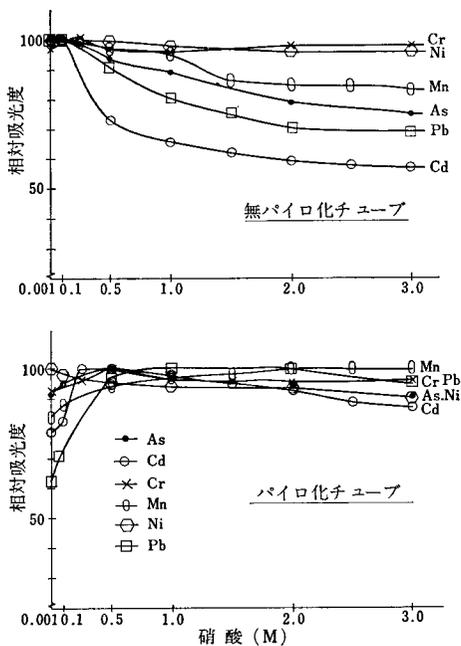


図3 各種金属の原子吸光度に対する硝酸の影響

低下させる傾向をみせており、ニッケルだけがわずかな硝酸の存在でも、その影響を受けて若干感度が低下することを示している。

d 単純溶解処理後に試料中に残存するおよその硝酸量は、 1.9 ± 1.1 mol, range 0.6~3.5 mol であった。

e マグネシウム、ニッケルなどを matrix として、炉内で試料に添加した場合の耐灰化温度の変化は、ヒ素と鉛について、それぞれ図-4と図-5に示すように、ヒ素では matrix なしで 300°C だったものが 1100°C に上昇し、しかもその感度が2倍に上昇して

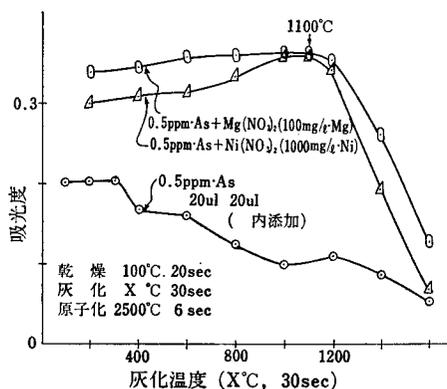


図4 灰化温度改善のためのマグネシウム、ニッケル添加の効果(ヒ素)

度を示すことを認めた。

b 基本的な耐灰化温度は、図-2にみられるように、ヒ素は 300°C 、カドミウム 400°C 、鉛 600°C 、マンガン 700°C 、ニッケル 1050°C 、クロム 1200°C の各濃度付近が耐灰化温度の限界で、これを越えた温度での灰化でそれぞれの元素が失われることを認めた。

c 原子吸光度に対する硝酸の影響は、図-3にみられるように、グラファイトチューブの種類、即ち、パイロ化の有無によりその様相は異なり、無パイロ化チューブでは、カドミウム、鉛、ヒ素、マンガンなど低沸点のものほど影響を強く受けて吸光度が低下し、しかも単純に硝酸の濃度に従って強く受ける傾向を示しているのに対し、パイロ化チューブでは、鉛、カドミウムなどにおいては硝酸が 0.5~1 mol 程度共存した方がかえって高感度を示し、それ以上の濃度で次第に感度を

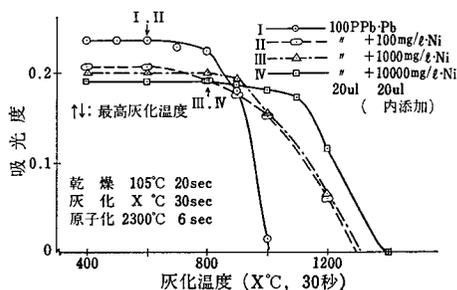


図5 灰化温度改善のためのニッケル添加の効果(鉛)

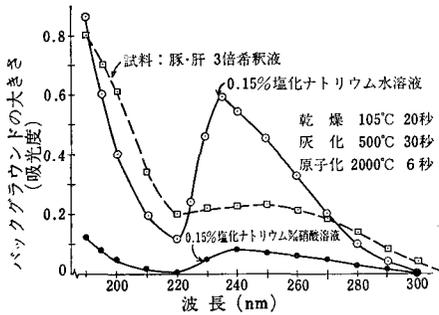


図6 バックグラウンドシグナルの吸光度曲線 (塩化ナトリウムと試料)

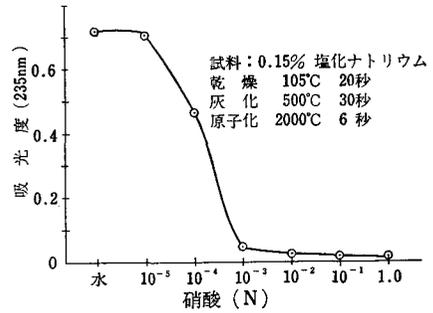


図7 塩化ナトリウムの吸光曲線に対する添加硝酸量の効果

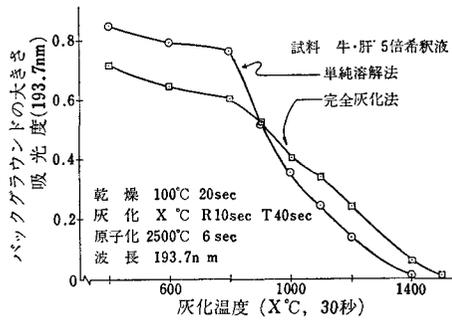


図8 試料の前処理方法の差異による灰化温度とバックグラウンドシグナルの変化

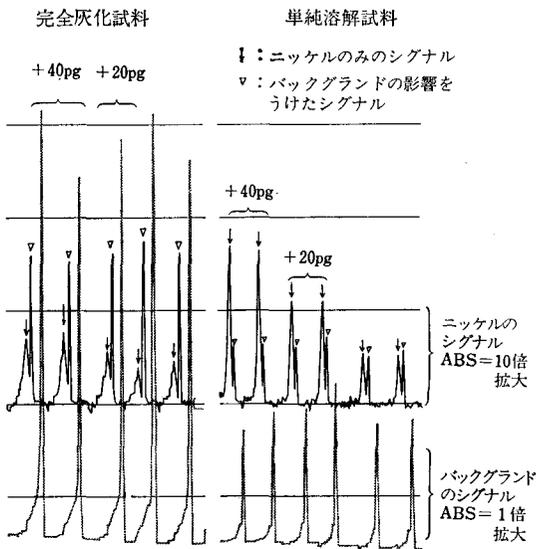


図9 異なる2つの前処理法による牛肝組織の原子吸光記録 (原素はニッケル、試料は原組織の5倍希釈溶液)

原子吸光測定のための電気炉プログラム：
 乾燥：105°C 40秒 灰化：1100°C, R15秒 T60秒
 原子化：2500°C 7秒
 試料注入量20 μ l 添加標準液20 μ l

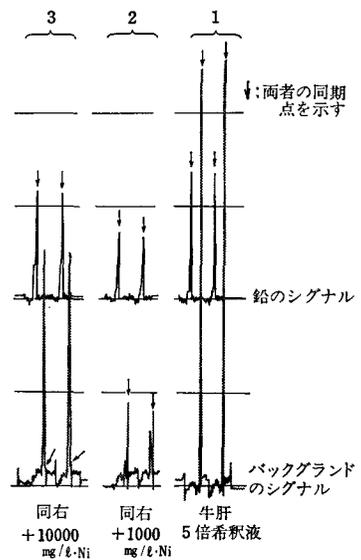


図10 バックグラウンドに対するニッケル添加の効果

おり、鉛についても、ニッケル1000mg/lの添加によって600°Cから800°Cに上昇することを認めた。

f 共存塩類がBGに与える影響のうち、塩化ナトリウムについては、図-6に示すように、matrixなしで190nmと235nm付近に大きな吸収を持つが、わずかな量の硝酸の添加で、そのBG吸収は著明に減少している。また、このナトリウムのBG除去に必要な硝酸量は、図-7に示すように、共存する塩化ナトリウム量に比較するとかなり小さな量になっている。

g 組織をそれぞれ単純溶解法と完全灰化法で処理して、そのBGの大きさを比較した結果は、図-8に示すように、電気炉内における灰化温度の高低によって様相が異なり、800°C以下の灰化処理では単純溶解試料が高く、900°C以上ではこれが逆転して単純溶解による試料の方が低くなっている。

h 実際に動物組織を2つの異なる前処理法で処理したものについて、その目的元素の原子吸光とBGによるエラーを比較したもののうち、ニッケルについての実験から図-9に示すレコードチャートが得られた。即ち、単純溶解によるものの方が著明にBGが小さく、かつ、ニッケルの原子吸光によるピークも大きく、直線性、回収率、再現性ともに完全灰化処理法よりすぐれていることを示している。

i 各元素別の原子吸光測定における電気炉プログラムの設定は、できるだけBGを小さくする灰化温度で、かつ、原子化時にできるだけBGピークと目的元素のピークをずらしうる（同期しない）原子化温度を選び出す実験の末、表-1に示す結果を得た。ヒ素と鉛については、硝酸マグネシウムまたは硝酸ニッケルなどのmatrixを炉内で添加して、灰化時の温度を上げ、BGを小さくしているがその実測例を図-10に示した。また、カドミウムについては、2000°Cと1600°Cの2つを試料中の共存物質の性質に応じて選択す

表1 測定条件

金属	ランプ電流 mA	試料注入量 μl	電気炉のプログラム・セッティング				D) グラファイトチューブ		
			乾 °C	燥 sec	灰 °C	化 sec		原子化 °C	化 sec
As		20	105	20	250, 1100 ³⁾	30	2700	6	std
Cd	5	10	105	20	500 ⁵⁾ 400	30	1600 ⁵⁾ 2000,	6	std
Cr	7.5	20	105	30	1200	R15 ²⁾ T45 ²⁾	2500	6	pyro
Mn	5	10	105	20	700	20	2500	6	std
Ni	10	20	105	30	1100	R15 T45	2500	6	pyro
Pb	6	20	105	20	600, 800 ⁴⁾	30	2300	6	std

注1) Std: 無パイロ化チューブ, Pyro: パイロ化チューブ

2) R: ランプ・モードの時間 T: 合計の灰化時間

3) Mg(NO₃)₂ 添加, 図-4 参照

4) Ni(NO₃)₂ 添加, 図-5 参照

5) 2000°CでBGが大きい場合に500°の灰化と1600°の原子化で好結果が得られる場合がある。

表2 単純溶解法と完全灰化法による測定値の比較

金 属	カドミウム ng/g	ク ロ ム ng/g	マ ン ガ ン μg/g	ニ ッ ケ ル ng/g	鉛 ng/g
単純溶解	99.1± 6.5	2.3± 0.3	4.0± 0.2	4.7± 0.3	240± 20
完全灰化	102 ± 5.4	2.4± 0.2	3.8± 0.2	6.1± 0.5	251± 23

試料牛肝 n=6

るようにしている。なお、これらの電気炉プログラムにより、牛肝組織を2つの異なる前処理法で処理したものについて測定した結果は、表-2に示すように、ニッケルを除いては著しい差異が認められていない。

4 考 察

本検討は、多数の生体試料をできるだけ単純な操作で正確に、能率よく処理できる方法を確立することを目指して出発したもので、その実現の可能性を探る場を、単純溶解法というようなこれまでの原子吸光測定の前処理法にはあまり用いられなかった手法の中に求めて実験を進めてきた。

初めに行なった、個々の金属の基本的な原子化温度と耐灰化温度についての実験は、個々の元素が、ほとんど matrix のない状況下で加熱に対して示す動きをつかむ目的で行なったもので、すでに原子吸光分析のガイドブックの中にもこれに類似したデータを見出すことができるが^{1),8),10)}、これに続いて行なった matrix を加えた実験結果の意義を理解する上の拠り所として必要なものであった。一般に、試料に matrix を添加して期待できる効用にはふたつの面が考えられ、ひとつは、塩化ナトリウムに対する硝酸の効果(実験 f, 図-6)にみられたように、試料中に共存する干渉物質の沸点を下げて炉内での灰化処理過程でこれを除去することで^{10),11)}、他のひとつは、ヒ素や鉛に対する硝酸マグネシウム、硝酸ニッケルの効果(実験 e, 図-4, 5)にみられるように、目的元素を飛散しにくくし(耐灰化温度の上昇)、それによって、高温での炉内灰化処理を可能にして、灰化過程の主たる目的である“共存物質の除去効果”を一層高める^{8),9)}、といったものである。ここで前者、即ち、ナトリウムの例はナトリウムの塩化物がもっとも飛びにくく、他の酸との塩では飛び易くなるといった幸運な例であって、いずれの元素もこのようにうまくゆくとに限らず、骨を試料とした場合のカルシウムなどはその除去が極めて困難な例で現在、その除去法について検討中である。

また、こうした matrix 効果は、単純な試料について行なった実験結果を基盤にして、実際の試料に適用してゆくわけであるが、生体試料が複雑な混合物であるために、基礎実験のとおりうまくゆくとに限らないのであるが、図-10に示した鉛の例は、基礎実験のデータからは若干ずれはしたが、ほぼそのまま肝組織にも適応できた例である。即ち、ニッケルを 1000mg/l 添加したもの(図中の2)が著明に低値になっているのは灰化中に鉛

が失なわれたことを意味し、このことは、これと同量のニッケルを標準液に添加しておこなった基礎実験のデータより耐灰化温度が低くなっていることを示しており、ニッケル 10000mg/ 添加したもの（図中の 3）は、灰化中に鉛が失なわれておらず耐灰化温度の上昇が十分になったことを示していると同時に、原子化時の鉛のピークとバックグラウンドのピークに時間的な解離が起きてバックグラウンド補正がより確かなものになったことも示している。この BG のピークと目的元素のピークが同期しなくなった点は、基礎実験のデータからは予測できなかったもので、重要な知見である。

各種元素の原子吸光の大きさに対する硝酸の影響をみた実験でグラファイトチューブの種類、即ち、パイロ化（パイロコーティング）の有無で影響が異なることが認められたこと（図一 3）は添加 matrix も含めてすべての共存物質からの影響の受け方、または至適灰化温度などについても、グラファイトチューブの品質によって変化する可能性を示唆しているものと思われる。従って、文献上のデータを読み取る場合にも、使用チューブについての記載に留意することが必要である。なお、単純溶解法で処理した試料中には、2 N 前後の硝酸が残存していることになっているが、パイロ化チューブを用いることにより、その影響を比較的小さくすることができると考えられる。

次いで、単純溶解法による試料と完全灰化法による試料の BG の大きさの比較（図一 8）で、炉内の灰化温度が 800°C 以下では前者の BG が大きく、900°C を越えると前者が小さくなったことは、900°C 以上の灰化温度に持ち込むことができれば、単純溶解法の方が有利になることを意味し、実験前の予想とは異なるものであった。また、これを実際にニッケルの測定に応用して得られた結果（図一 9）は、その差、即ち、単純溶解法の有利な点を明確に示すもので、これまで長い間、標準的手法である完全灰化法を用いて試料を処理し、これを直接原子吸光度計のグラファイト炉に添加して幾度か失敗を重ねてきた筆者らにとって極めて貴重な知見であった。なお、この完全灰化法で処理した試料中に存在する 1000°C の灰化処理で消去できない BG 物質は、完全灰化のために加えられる硫酸または過塩素酸によって化成されるものと考えられる^{12),13)}。

ま と め

フレームレス原子吸光分析法におけるグラファイト炉内の処理過程即ち、試料の乾燥、灰化、原子化、原子化後（フラッシュ）のうち、灰化過程における妨害共存物質の除去効果に望みをかけて、簡易かつ単一の試料前処理法を検討し、単純溶解法と名づけた単純な前処理操作で生体試料中のヒ素、鉛、カドミウム、クロム、マンガン、ニッケルなどについて、従来の完全灰化法による前処理よりも至適であると考えられる測定条件を見出すことができた。なお、従来、微量金属の測定操作上もっとも困難と目されていたのは、操作中に起きやすい金属のコンタミネーションをどのように防ぐかということであったが、この単純溶解法では、操作段階が少なく、かつ、単純であるために、コンタミネーションによるエラーを著明に防ぎやすくできる結果をもたらした。

文 献

- 1) 保田和雄, 長谷川敬彦. 試料の調製. 原子吸光分析: 186~248, 講談社サイエンティフィック, 1976.
- 2) 野本昭三. 生体試料中微量金属の測定法. 微量金属代謝. 第7集: 1~10, 1979.
- 3) Thomas F. Murphy, et al. Measurements of blood lead by Atomic Absorption Spectrometry. *Annals of Clinical Laboratory Science*, Vol. 1, No. 1 :57~63, 1971.
- 4) Shozo Nomoto and F. William Sunderman, Jr.. Atomic Absorption Spectrometry of nickel in serum, urine, and other biological materials. *Clinical Chemistry*, Vol. 16, No. 6 :477~485, 1970.
- 5) Hans Zachariassen, et al. Technique for determining nickel in blood by Flameless Atomic Absorption Spectrophotometry. *Clinical Chemistry*, Vol. 21, No. 4 :562~567, 1975.
- 6) William Torjussen, et al. Nickel content of human palatine tonsils : analysis of small tissue samples by Flameless Atomic absorption Spectrophotometry. *Clinical Chemistry*, Vol. 23, No. 6 :1018~1022, 1977.
- 7) Dusanka Mikac-Devic, et al. Furildioxime method for nikel analysis in serum and urine by Electrothermal Atomic absorption Spectrometry. *Clinical Chemistry*, Vol. 23, No. 6 :948~956, 1977.
- 8) Standard HGA Conditions : As, Perkin-Elmer HGA Cook Book, 1978.
- 9) G. G. Welcher, et al. Direct determination of trace quantities of lead, bismuth, selenium, tellurium, and thallium in high Temperature alloys by Non-Flame Atomic absorption Spectrophotometry, *Anal. Chem.* 46 :1922, 1974.
- 10) 保田和雄, 広川吉之助. 高感度原子吸光・発光分析: 123, 講談社, 1976.
- 11) 内野興一, 小泉英明. 原子吸光分析におけるバックグラウンド補正の進歩. *ぶんせき*: 29, 1975.
- 12) 札川紀子, 川瀬晃. 黒鉛炉原子吸光分析法におけるニッケルの定量. *分析化学*, 27 : 37, 1978.
- 13) 平林延雄. 原子吸光分析におけるバックグラウンド補正. *科学と工業*, 52 : 421,

(1980年9月30日 受付)