

Sulfide sulfur in 0.1 M potassium hydroxide-0.1 M potassium chloride solution (3 or 10 ml) was electro-deposited onto a silver microelectrode (3 mm ϕ , 7 mm² or 5 mm ϕ , 20 mm²) as silver sulfide at -0.93 V *vs.* Pt (-0.3 V *vs.* SCE) for 30 or 10 min. The electrode was then rinsed with water and acetone. An ion microanalyzer was used to determine the sulfur on the electrode surface under the following conditions: primary ion, Ar⁺; primary ion-accelerating voltage, 3 kV; primary ion current, 0.1 μ A; primary beam diameter, 1 mm; secondary ion-accelerating voltage, 3 kV. The ³²S⁻ and ¹⁰⁷Ag⁻ intensities were measured after 1 and 5 min of bombardment with the primary ion beam, respectively. The relationship between the ³²S⁻/¹⁰⁷Ag⁻ intensity ratio and the sulfide concentration in the original sample solution was linear over the range of

3 to 45 ng S/3 ml or 0.1 to 2 μ g S/10 ml. The precisions were *ca.* 30% at 15 ng S/3 ml and *ca.* 10% at 0.5 μ g S/10 ml. The method was applied to the determination of low ppm of sulfur in sponge titanium {sample taken (5~10) mg} combined with the hydrogen sulfide evolution method.

(Received Oct. 7, 1977)

Keywords

Ion microanalyzer

Silver microelectrode

Sulfide sulfur

Sponge titanium

原子吸光分析法による骨中の銅，カドミウム及び亜鉛の定量

石野二三枝*， 松前久子， 柴田寛一**， 有賀那加夫***， 五島文韶*

(1977 年 10 月 25 日受理)

豚の下がく（顎）枝を試料として用い、骨中の銅、カドミウム及び亜鉛の原子吸光分析法について基礎的な検討を行った。試料片の脱脂を行った後に加熱減圧法で乾燥すると、サンプリングのばらつきを除くことができ、乾燥時間の短縮も可能であり、1時間以内で恒量にすることができた。又、灰化法としては硝酸及び過酸化水素水による湿式法と乾式法を併用した結果、試料を1gとした場合の灰化所要時間は1時間であった。標準添加法により定量した分析値は銅 1.10 μ g/g、カドミウム 0.46 μ g/g 及び亜鉛 344 μ g/g であり各変動係数は 5.3%、4.9% 及び 7.0% であった。従って、本法を適用することにより分析所要時間をかなり短縮することができる。

1 緒 言

生体試料中の重金属の分析は環境汚染における汚染度を明確にするのみならず、生理学的にもあるいは生化学的領域における知見を得るためにも重要な意義がある。原子吸光分析は金属の分析に広く利用され、生体試料においても血液¹⁾²⁾、尿³⁾などの体液成分を対象とした報告は数多く見られる。しかしながら、臓器⁴⁾、組織⁵⁾などの試料に関する報告は比較的少なく、特に骨⁶⁾あるいは歯⁷⁾⁸⁾などの硬組織の分析例は極めて少ない。その理由

としては試料の状態と乾燥方法、灰化法の選択、あるいは共存する無機成分の影響など分析化学的に未解決の問題を多く含んでいることが挙げられる。これらの諸問題を解明しなければ、生体試料の分析結果そのものに対する信頼度は低くならざるを得ない。本実験では豚の下がく枝を用い、試料の乾燥方法、灰化方法及び抽出方法に関する基礎的な検討を行ったので、結果を報告する。

2 実 験

2.1 装 置

装置は日立 508 型原子吸光分析装置、バーナーは空気-アセチレン用スリースロット型、光源には日立中空陰極ランプを使用した。試料の乾燥には島津製作所製の元素分析用微量検体乾燥器 SD-2 型を使用し、減圧にはアスピレーターを用いた。

* 岐阜大学教育学部化学教室：岐阜県岐阜市長良城内

** 岐阜歯科大学口腔外科学教室第2講座：岐阜県本巣郡穂積町高野

*** 岐阜大学教養部化学教室：岐阜県岐阜市長良城内

2.2 試 薬

金属標準溶液は半井化学薬品製の銅, カドミウム及び亜鉛の原子吸光分析用標準液 (1000 ppm) を使用時に必要濃度に希釈調製した. APDC 溶液は和光純薬製原子吸光分析用ピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウムの 2%-水溶液 (w/v) を使用時に調製した. メチルイソブチルケトン (以下 MIBK と略記), 過酸化水素水, 水酸化アンモニウムは特級試薬を使用し, 硝酸は精密分析用試薬を用いた. エチルエーテルは 1 級試薬を蒸留して使用した.

2.3 試 料

試料として豚の下がく枝の表面をよく水洗し自然乾燥後, ケルダールフラスコに入る 程度の大きさに切断した. これをエチルエーテルを用いて (2~3) 時間脱脂後, 110°C で 1 時間加熱減圧乾燥し, デシケーター中に保存する.

2.4 定量操作法

2.3 で述べた試料 (0.4~1)g をケルダールフラスコに正確に量り取り濃硝酸 (3~5)ml を加えて加熱溶解後, ホウケイ酸ガラス製ビーカーに移し入れ 30%-過酸化水素水を数滴加えて蒸発乾固する. これを (350~400)°C で 5 分間乾式灰化後, 硝酸及び過酸化水素水の混合溶液 (1:1 v/v) 数滴で湿らせ再び同温で 5 分間灰化すると試料は白色となる. もし白色とならなければ再び灰化の操作を繰り返す. これを 6 M 硝酸 5 ml に溶解した後正確に 50 ml に希釈し, 0.5 ml を分取し亜鉛試料溶液として保存する. 残りの試料溶液 49.5 ml に水酸化アンモニウムを滴加して pH 2~3 に調整後, 分液漏斗に移し 2% APDC 溶液 5 ml 及び MIBK 5 ml を加えて 10 分間振り混ぜた後, MIBK 相の吸光度を Table 1 に示す条件で測定し銅及びカドミウムを定量する. 亜鉛の保存溶液 0.5 ml に水を加えて 50 ml とし, 同様の操作により亜鉛の定量を行う.

Table 1 Analytical conditions for atomic absorption spectrophotometry

	Cu	Cd	Zn
Wavelength (nm)	3247	2288	2138
Lamp current (mA)	15	8	10
Slit width (mm)	2	2	2
Air flow rate (l/min)	10	10	10
Acetylene flow rate (l/min)	1	1	1
Position of burner (mm)	2	2	2

3 結果と考察

3.1 試料の乾燥方法の検討

従来の報告によれば歯質あるいは骨の乾燥条件として, 80°C, 48 時間⁶⁾, (110~120)°C, 24 時間⁷⁾, 110°C, 8 時間⁸⁾, などとなっており, 乾燥温度及び乾燥時間にかかなりの差が認められる. 試料の形, 大きさ, 保存状態などによって乾燥条件に幅が生ずることは考えられることであるが, 乾燥条件の確立は信頼度の高い分析値を得るためにも, 又, 分析所要時間を短縮するためにも重要である. 豚の下がく枝を皮質部とずい(髓)質部とに分け試料の乾燥に関する基礎的検討を行った結果, 皮質部は (2~4) 時間で恒量に達するが, ずい質部は 12 時間以上加熱しても恒量に達せず, 徐々に減量することが認められた. しかしながら, 加熱減圧法によれば, ずい質部の場合でも 6 時間程度で恒量に達することが明らかになった. 加熱減圧法⁹⁾ は各種の食品の水分定量の基準法になっておりその正確さ, 再現性ともに優れていることが認められているが, 本実験の場合もずい質部のような多孔質の部位の乾燥に有効であることが確認できた. なお, 乾燥温度の設定に関しては, 本実験の場合は特に低温度である必要はないので吸着水を考慮し 110°C とした. 試料によっては, 乾燥条件を一定にしても, もとの試料に対する乾燥減量比に大きなばらつきが生ずる場合もある. 特に脂質の多い試料では乾燥中に水分だけでなく試料中の脂質の一部が溶け出し, しかも一定時間内に溶け出す脂質量は試料の形, 大きさなどによって異なるので, これがひょう量のばらつきの原因となっていると考えられる. そこで試料の脱脂についての検討を行った. 脱脂はソックスレー抽出器を用いて行い, 試料片をエチルエーテルで (2~3) 時間脱脂した. 脱脂による減量は皮質部で約 3%, ずい質部では約 15% であった. 脱脂後の試料について加熱減圧乾燥法により 110°C で乾燥した結果を Fig. 1 に示す. Fig. 1 から明らかなように, 乾燥時間は 1 g の試料の場合には約 30 分間で恒量に達し, 5 g の場合でも皮質部, ずい質部ともに 1 時間で恒量に達する. 従って, 試料の脱脂操作を実施した場合には, サンプルング時におけるばらつきが解消されるだけでなく, 乾燥時間の短縮も可能であることが明確になった.

3.2 試料溶液の調製法

2.3 で述べた試料約 1 g を硝酸を用いて加熱溶解すると (20~30) 分間で透明な黄色溶液が得られた. この硝酸溶液を試料とした場合の分析値は低く, 再現性の点でも

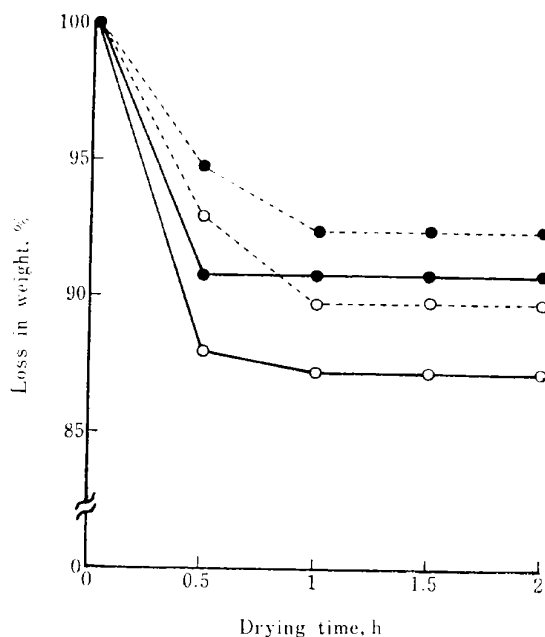


Fig. 1 Drying of defatted sample

Temperature: 110°C; ● Cortex; ○ Bone marrow;
— 1 g of sample; ---- 5 g of sample

満足な結果は得られなかったもので、更に灰化法について検討を加えた。まず、i) 硝酸に溶解後、更に加熱を続ける湿式灰化法、ii) 硝酸に溶解後、過酸化水素水を加えながら湿式灰化する方法、iii) 硝酸に溶解後蒸発乾固し 400°C で乾式灰化する方法、iv) 硝酸に溶解後蒸発乾固し、灰化補助剤として硝酸及び過酸化水素水の混合溶液で湿らせながら乾式灰化する方法の 4 方法について比較検討した。Fig. 2 に明らかなように i) 法では長時間の加熱が必要であり、分析値のばらつきが大きい、ii) 法では 3 時間の灰化時間で分析値は一定となり過酸化水素の効果認められた。iii) 法ではカドミウムに関しては ii) 法と一致するが、銅及び亜鉛の分析値は ii) 法と比較して常に低いことが確認された。このことは灰化によって生ずる炭化物への吸着に起因するものと考えられる。iv) 法では炭化物の存在は認められず、3 元素の分析値は再現性の点でも優れていた。3 元素の定量のための灰化法としては Fig. 2 の結果より ii) 法の硝酸及び過酸化水素水を用いて 3 時間以上湿式灰化する方法も有効であるが、本実験では分析所要時間の短縮可能な iv) 法を採用することとした。

3.3 抽出時における過酸化水素の影響

3.2 の検討結果より、過酸化水素水が灰化に有効であることが明らかになった。しかしながら、過酸化水素水を多量に用いた場合にはカドミウム及び亜鉛の分析値が低値を示すことを認めた。そこで 2.2 で調製した金属標

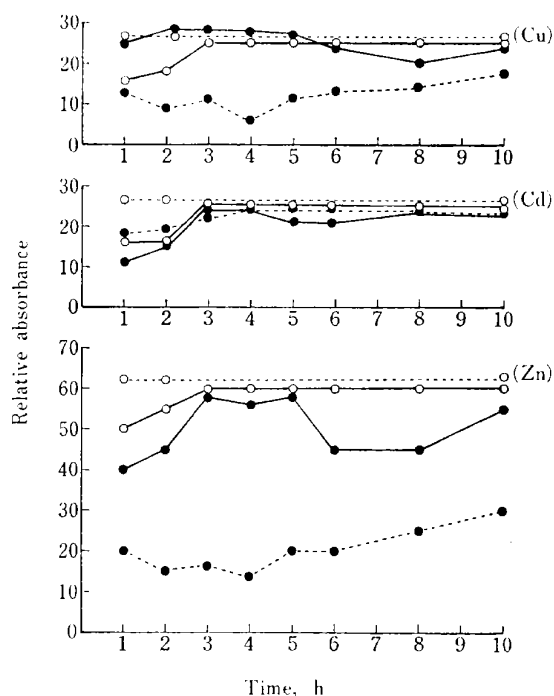


Fig. 2 Comparison of ashing methods

—●— Ashed in HNO₃; —○— Ashed in HNO₃ and H₂O₂; - -●- - Ashed at 400°C after dissolved in HNO₃; - -○- - Sample was dissolved in HNO₃ and then dried and ashed by using HNO₃ and H₂O₂ at (350~400)°C

準溶液を用いて過酸化水素が各元素の MIBK 抽出に及ぼす影響について検討した。銅 (0.02 ppm)、カドミウム (0.01 ppm) 及び亜鉛 (0.02 ppm) の混合試料溶液 50 ml に 30% 過酸化水素水の各量を添加し 0~1% の過酸化水素を含む各混合試料溶液を調製した。各混合試料溶液に APDC 溶液及び MIBK 各 5 ml を加えて抽出し原子吸光分析を行った結果を Fig. 3 に示す。銅についての影響は認められないが、カドミウム及び亜鉛に対する妨害は明らかである。従って、3.2 の灰化法において過酸化水素を用いた場合には試料を蒸発乾固して過酸化水素を完全に追い出す必要がある。

3.4 APDC 量の検討

2.3 で述べた試料約 1 g を用いて 2% APDC 溶液の必要量について検討した。Fig. 4 に示すように 2% APDC 溶液 1 ml で銅は完全に抽出されるが、カドミウムについては亜鉛が多量に存在するため 3 ml 以下では抽出が不完全であることが明らかになったので本実験では 5 ml を用いることとした。

3.5 抽出時の pH に関する検討

水相の pH 変化による 3 元素の抽出率への影響につい

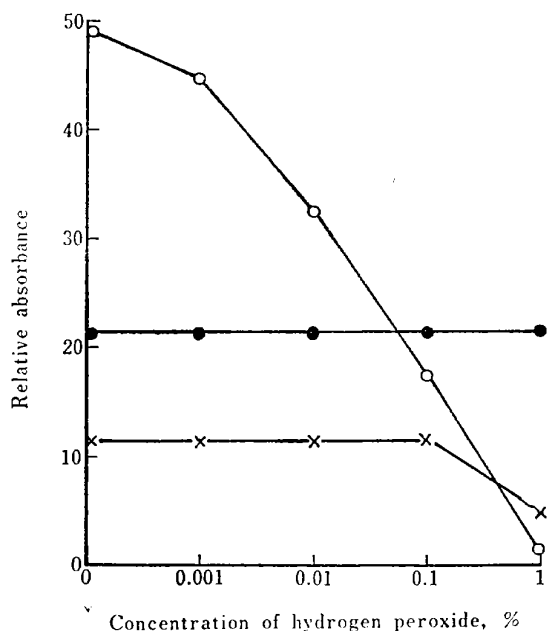


Fig. 3 Effect of concentration of hydrogen peroxide on extraction

—○— Zn; —●— Cu; —×— Cd

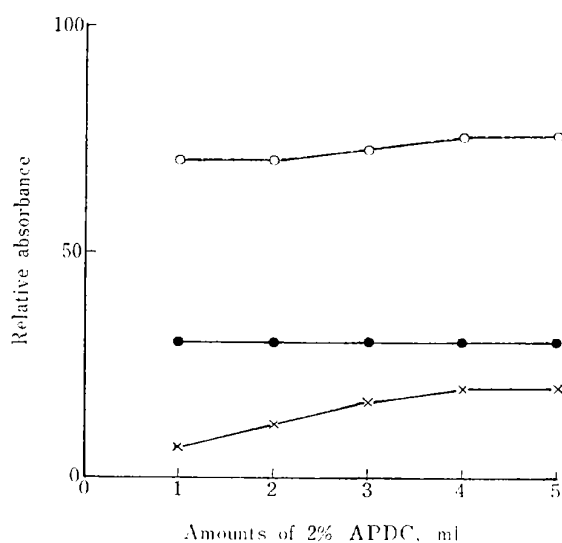


Fig. 4 Relation between absorbance and amounts of APDC

—○— Zn; —●— Cu; —×— Cd

て検討するために, 3.2 で得られた試料溶液に種々の量の水酸化アンモニウムを用いて pH を変化させた. このとき pH 3.5 以上では多量の沈殿を生じたが, 沈殿を含む試料溶液中へ APDC 溶液及び MIBK を加えて抽出した. 又, 抽出操作後, 沈殿を水相より遠心分離し, その沈殿を硝酸に溶解し pH 2.5 において再び抽出して沈殿中の 3 元素についても測定した. なお, 亜鉛については MIBK 抽出液を 100 倍に希釈した場合及び 100 倍に希釈した試料溶液を用いて抽出した場合の両法につ

いて測定した. Fig. 5 はその結果である. 3 元素ともに完全に抽出されるのは pH 2~3 の範囲であった. 又, pH 3.5 以上において完全に抽出されないのは, キレート生成が不完全であること以外に一部が沈殿に吸着されるためであると考えられる.

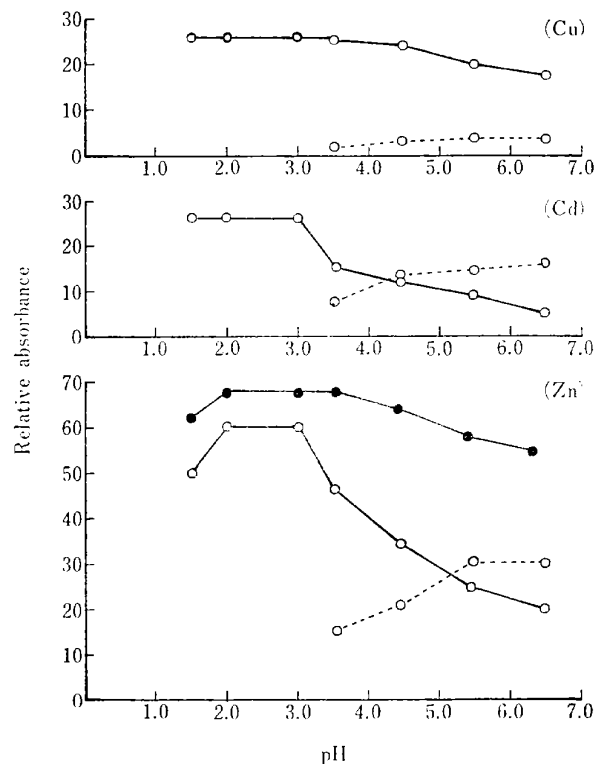


Fig. 5 Effect of pH on extraction

—○— In sample solution containing precipitation;
--○-- In precipitation after extraction; —●— In sample solution diluted with distilled water; Zn was determined in diluted MIBK solution.

3.6 亜鉛の定量法に関する検討

骨中に亜鉛は多量に存在するため, 原子吸光分析を適用する場合には試料溶液の希釈を必要とする. 希釈の方法として, MIBK 抽出液を希釈する場合と抽出前の試料溶液を希釈する方法について検討した. Fig. 5 に明らかなように MIBK 抽出液希釈の分析値のほうが低い値となり, (10~30)% の差が確認されたため, 亜鉛については試料溶液の全容量の 1/100 を正確に採り亜鉛抽出

Table 2 Analytical results

	Number of measurement	max. (µg/g)	min. (µg/g)	Mean (µg/g)	Coefficient of variation (%)
Cu	6	1.16	1.03	1.10	5.3
Cd	6	0.48	0.42	0.46	4.9
Zn	6	378	312	344	7.0

Sample weight : (0.43~0.55)g

用の試料溶液とした。

3.7 定量結果

Table 2 は 2.4 の定量操作法に従って 2.3 で述べた試料中の銅、カドミウム及び亜鉛の定量を標準添加法により行った結果である。

4 結 論

骨(豚の下がく枝)中に含まれる銅、カドミウム及び亜鉛の原子吸光分析のためのサンプリング及び試料溶液調製法に関する検討を行った。エチルエーテルを用いて試料を脱脂した場合、110°C の加熱減圧乾燥法により 1 時間以内で恒量に達し、従来法と比較して乾燥時間の短縮と同時にサンプリングによるばらつきが減少し脱脂の効果が認められた。又、脱脂を行わない場合には試料の乾燥条件を一定にしても、試料の採取方法、形状、組織構造などによって試料中の残存水分量が著しく異なることが明らかになった。灰化法としては試料を硝酸に溶解したものを蒸発乾固した後、硝酸及び過酸化水素水を灰化補助剤に用いて乾式灰化する方法を採用した。灰化所要時間については試料を 1 g としたとき 1 時間以内で無色透明の試料溶液の調製が可能であった。標準添加法により豚の下がく枝中の 3 元素の定量を行った結果、脱脂乾燥重量当たり銅 1.10 µg/g、カドミウム 0.46 µg/g 及び亜鉛 344 µg/g の各分析値が得られ、変動係数はそれぞれ 5.3%、4.9% 及び 7.0% であった。本法は従来法と比較して分析所要時間が短く再現性も優れているため、骨中の銅、カドミウム及び亜鉛の原子吸光分析に有効である。

文 献

- 1) 三島昌夫：本誌，**24**，433 (1975)。
- 2) F. D. Posma, J. Balka, R. F. M. Herber, E. J. Stuik : *Anal. Chem.*, **47**, 834 (1975)。
- 3) I. W. F. Davidson, W. L. Secrest : *ibid.*, **44**, 1808 (1972)。
- 4) 瓦家敏男，川崎美保子，春木孝祐，富田絹子，岡三知夫，堀口俊一：本誌，**25**，464 (1976)。
- 5) E. R. Blood, G. G. Grant : *Anal. Chem.*, **47**, 1438

(1975)。

- 6) 梶本雅俊，島田 清，大西和男，柚山忠道，西山敬太郎：日衛誌，**25**，34 (1970)。
- 7) 金子芳洋：口腔衛生学会誌，**21**，227 (1971)。
- 8) 山本十糸子，大塩英雄：同上，**23**，192 (1973)。
- 9) 永原太郎，岩尾裕文，久保彰治：“食品分析法”，p. 85 (1970)，(柴田書店)。

☆

Determination of copper, cadmium and zinc in bone by atomic absorption spectrophotometry.

Fumie ISHINO*, Hisako MATSUMAE, Kan-ichi SHIBATA**, Nakao ARIGA*** and Fumiaki GOSHIMA* (*Faculty of Education, Gifu University, Shironouchi, Nagara, Gifu-shi, Gifu; **The 2nd Department of Oral Surgery, Gifu College of Dentistry, Takano, Hozumi-cho, Motosu-gun, Gifu; ***Faculty of General Education, Gifu University, Shironouchi, Nagara, Gifu-shi, Gifu)

The methods of drying and ashing for the determination of trace metals in bone were studied. Bone (the mandibular ramus of swine) was treated with ethyl ether for the purpose of removing lipid. By applying this technique, it was possible to avoid the scattering of weight and the reduction of drying time of the sample. On drying the sample at 110°C under reduced pressure by using an aspirator, a constant weight was reached within an hour. Dried sample (0.4~1) g was dissolved in 5 ml of nitric acid by heating. Then a few drops of 30% hydrogen peroxide were added to the solution and it was evaporated to dryness. The residue was ashed at (350~400)°C for 10 minutes. After being adjusted to pH 2~3, trace metals were extracted with MIBK in the presence of 5 ml of 2% ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (APDC). The MIBK layer was analyzed by atomic absorption spectrophotometry. The coefficients of variation by using the method of standard addition were 5.3% for copper, 4.9% for cadmium and 7.0% for zinc. The proposed method is rapid and simple, and will be applicable to the determination of trace elements in bone.

(Received Oct. 25, 1977)

Keywords

Atomic absorption spectrophotometry
Bone
Cadmium
Copper
Zinc