

# 黒鉛炉原子吸光法による骨の中のベリリウムの定量

## ——ポリリン酸の超音波分解法の利用——

中島 良三<sup>®</sup>, 鎌田栄二郎, 柴田 正三\*

(1983 年 1 月 20 日受理)

骨の中の微量のベリリウムを灰化・酸分解後、アセチルアセトン (AA) 及びメチルイソブチルケトン (MIBK) を用いて抽出分離し、黒鉛炉原子吸光法により定量する際、試料中に生じたポリリン酸の妨害を除くため、塩酸酸性又は過塩素酸酸性試料溶液に超音波を照射する方法を試みた。その結果、超音波照射法が、ポリリン酸の分解に有効であることを認めた。又、試料の前処理及び抽出条件に若干の修正を加えた。試料は 500°C 以下で灰化し、過塩素酸を加えて加熱分解・蒸発乾固した後、過塩素酸及び水を加えて溶解し、半量になるまで加熱濃縮し、次いで超音波照射を行う。溶液に AA 及び EDTA を加えて pH を 8.5 に調節し、一夜放置後 MIBK で 2 回抽出する。有機相を水で十分洗浄し、2 M 塩酸で逆抽出する。水相は適宜濃縮し、標準添加法でベリリウムを定量する。実試料として豚及び牛の骨を採取し、生試料 1 g 当たり (0.2~1.0) ng のベリリウムを検出した。又、試料の採取法についても若干の検討を加えた。

## 1 緒 言

ベリリウムの分析法は岩石、水及び生体試料など種類の試料について検討されているが、そのほとんどは EDTA 共存においてアセチルアセトン (AA) 錯体を抽出する方法に基づいている。骨の中のベリリウムの分析法はこれまで Toribara ら<sup>1)2)</sup>, Sill ら<sup>3)</sup>, 及び重松ら<sup>4)</sup>の報告が見られるが、いずれも AA を用いる抽出法が利用されている。主成分のリン酸カルシウムの分離に Toribara ら及び重松らは、あらかじめ硫酸塩としてカルシウムを沈殿させている。Sill らは EDTA の存在下で直ちに AA 錯体として抽出する方法を採用している。

既報<sup>5)</sup>において、Sill らの方法で骨の中のベリリウムの定量を行った結果、その回収率は必ずしも満足すべきものではなかった。生体試料中のベリリウムの量は毛髪中で (0.6~3.5) ppb であり<sup>6)</sup>, 特にベリリウムを扱っていない人の場合には 1 ppb 以下であった。骨の中のベリリウムもこの程度の量と予想される。従って分析法としてはできるだけ空試験値の低い、検出感度の高い方法を採用する必要がある。そこで著者らはこの方法を更に詳細に検討し、抽出における諸条件に若干の修正を加えた。又、試料の灰化過程で生ずるポリリン酸の分解に

は過塩素酸による加熱分解法については当然のこと、超音波照射法による方法についても検討し、その有効であることを確かめ、両方法を併用することにより骨の中の微量のベリリウムの黒鉛炉原子吸光法に基づく定量操作法を決めた。又更に実試料として豚及び牛の骨を分析すると同時に試料の採取部位とベリリウム含有量との相関についても若干の知見を得たので報告する。

## 2 試薬及び試料の採取

### 2.1 装 置

装置は日立製二波長原子吸光分析装置 308 型に同社製 HGA フレームレスアトマイザーを組み合わせて使用した。光源には日立製中空陰極ランプを、バックグラウンド補正には浜松テレビ製高輝度重水素放電管を使用し、ランプ電流はそれぞれ 8 mA, 20 mA とした。測定波長は 234.9 nm を用い、スリット幅は入口、出口とも 0.18 mm を用いた。

ポリリン酸の分解には国際電気製、超音波洗浄器 UA 50 型 (30 kHz, 出力 40 W) を使用した。又試料の分解、溶液の濃縮は空試験値をできるだけ低下させるために、日立製クリーンベンチ (ECV, 301 AN 型) 内で行い、その際ホットプレート上に設置したパイレックスガラス製フード (Fig. 1) を使用した。

### 2.2 試 薬

ベリリウム標準溶液：特級硫酸ベリリウム四水和物 195.6 mg を採り、0.2 M 塩酸に溶解して 100 ml とし

\* 工業技術院名古屋工業技術試験所：愛知県名古屋市北区平手町 1

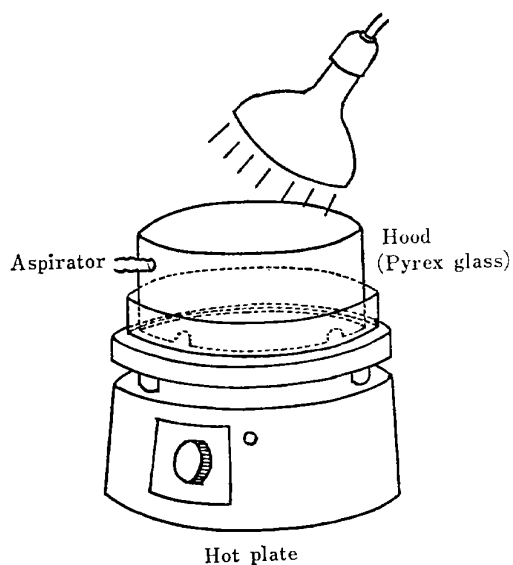


Fig. 1 Hood for sample dissolution and evaporation in a clean bench

た。

リン酸カルシウム溶液: 特級炭酸カルシウム 4.84 g を特級リン酸 85 %, 2.20 ml と混合し, 過塩素酸 8 ml を加えて溶解する。これを蒸留水で正確に 100 ml にうすめたものを使用した。この溶液 1 ml は 50 mg の  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  に相当する。

0.5 M EDTA 溶液: 特級 EDTA·4Na·4H<sub>2</sub>O 56.53 g を蒸留水に溶解して 250 ml とした後, 乾燥汚紙で汚過したものを使用した。なお, この溶液は使用前にメチルイソブチルケトン (MIBK) 及び AA を加えて振とうすることにより精製した。

塩酸 36 % 及び過塩素酸 60 % は和光純薬製, 有害金属測定用を, その他の試薬はすべて特級品を使用した。精製水はイオン交換水を Millipore 製, Milli-Q 純水製造システムに通したものをを用いた。

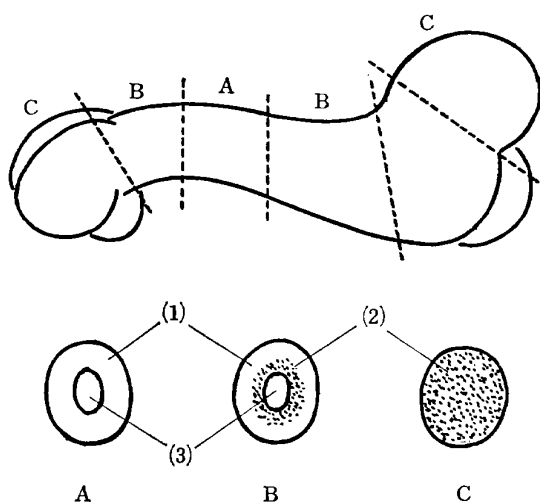


Fig. 2 Sampling on pork thighbone

(1) Substantia compacta, (2) Substantia cancellous, (3) Substantia medullaris

## 2.3 試料の採取

分析試料は市販の食用豚又は牛の上ばく骨又は大たい骨を Fig. 2 のように切り取り, 中心部の髄質を除き, 500 °C 以下で灰化後めのう乳鉢で微粉碎して調製した。Fig. 2 に示すように A 部はほとんど密質, C 部は海綿質, 中間の B 部は密質と海綿質より成り, 従って灰分は中央より端へ行くに従って少なくなる。豚及び牛の各別個の骨より採取した A 部の数個ずつの試料について灰分を求めたところ, それぞれ  $(56.9_2 \pm 1.9_2) \%$ ,  $(65.0_7 \pm 0.4_9) \%$ , とほぼ一定であった。従ってこの方法により再現性よく試料を採取できると考えられる。

## 3 実験及び結果

### 3.1 分析操作法

灰化試料 1 g を石英ビーカーに採り, 過塩素酸 2 ml を加えて加熱溶解し, ほとんど乾固するまで蒸発する。再び過塩素酸 2 ml を加えて溶解後 200 ml ビーカーに移し, 精製水 50 ml を加えて液量が 25 ml 程度になるまで加熱蒸発させた後超音波を 60 分照射する。この溶液にあらかじめ精製した EDTA 溶液 20 ml, AA 2 ml を加え, 精製水を加えて 100 ml 程度とし, 20 % 水酸化ナトリウムを加えて pH を 8.5 に調節する。溶液は 12 時間以上放置した後 200 ml 分液漏斗に移し, 液量を 150 ml とする。次いで MIBK 10 ml を加えて 5 分間振とうする。静置後水相を別の分液漏斗に移し, 再び MIBK 10 ml を加えて 5 分間振とうする。2 回の有機相を合わせて 5 ml の精製水を加えて数回振とうして洗浄し, 静置後洗液を捨てる。洗浄はなお数回行い, 有機相中に溶解したリン酸カルシウム, 無機塩類を除去する。得られた有機相に 2 M 塩酸 5 ml を加えて 5 分間振とうし逆抽出する。水相は 10 ml ビーカーに移し, 更に有機相を少量の精製水で 2 回洗浄し, 洗液を 10 ml ビーカーに加える。この溶液はクリーンベンチ内で加熱し,  $(0.2 \sim 0.3) \text{ ml}$  程度まで濃縮した後, 乾燥したメスシリンダー (容量 2.5 ml, 1/10 ml 目盛り付き, 容量補正したもの) に洗い移し, ベリリウムの含有量に応じて  $(1 \sim 2.5) \text{ ml}$  の適当な容量とし, しばらく静置後容量を読み取る。操作空試験値についても同様に処理し, 標準添加法によりベリリウムを定量する。

### 3.2 原子吸光測定条件

試料溶液は 20  $\mu\text{l}$  ずつ注入した。又ベリリウム含量が低い場合には 40  $\mu\text{l}$  注入することとし, 更にジルコニウムカーバイド処理したアトマイザー<sup>7)</sup>を使用するか, 原子化時にアルゴン流量を通常の場合の半分に減らすこと

Table 1 Decomposition of pyrophosphate with ultrasonic irradiation

| No. | Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ·10 H <sub>2</sub> O<br>taken (g) | Irradiation<br>time (h) | Concentrated acid<br>added (ml) | Be recovered† |     |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------|-----|
|     |                                                                                 |                         |                                 | (ng)          | (%) |
| 1   | 0.8                                                                             | 1.5                     | HCl 2.0                         | 14.4          | 72  |
| 2   | "                                                                               | 2.0                     | "                               | 19.8          | 99  |
| 3   | "                                                                               | 4.0                     | "                               | 19.8          | 99  |
| 4   | "                                                                               | 6.0                     | "                               | 20.4          | 102 |
| 5   | "                                                                               | 1.5                     | HCl 3.0                         | 19.7          | 99  |
| 6   | "                                                                               | "                       | HCl 4.0                         | 19.5          | 97  |
| 7   | 1.2                                                                             | 4.0                     | HCl 2.0                         | 16.9          | 85  |
| 8   | "                                                                               | 6.0                     | "                               | 19.6          | 98  |
| 9   | 1.6                                                                             | 4.0                     | "                               | 13.1          | 66  |
| 10  | "                                                                               | 6.0                     | "                               | 16.9          | 85  |
| 11  | 0.8                                                                             | 1.0                     | HClO <sub>4</sub> 2.0           | 18.2          | 91  |
| 12  | "                                                                               | 2.0                     | "                               | 19.5          | 98  |
| 13  | 1.2                                                                             | 3.0                     | "                               | 17.3          | 86  |
| 14  | "                                                                               | 4.0                     | "                               | 19.2          | 96  |

Be taken : 20 ng; Each solution volume was arranged to 10 ml except that 11~14 was 25 ml. † Mean of two determinations

Table 2 Decomposition of pyrophosphate by heating of perchloric acid solution

| No. | Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ·10 H <sub>2</sub> O<br>taken (g) | Treatments                                                                                                            | Be recovered† |     |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-----|
|     |                                                                                 |                                                                                                                       | (ng)          | (%) |
| 1   | 0.8                                                                             | Two ml of HClO <sub>4</sub> and 50 ml of water were added and the solution was evaporated to half the initial volume. | 17.5          | 88  |
| 2   | "                                                                               | Two ml of HClO <sub>4</sub> and 50 ml of water were added and the solution was evaporated to dryness.                 | 18.5          | 93  |
| 3   | "                                                                               | After fuming up to dryness with 2 ml of HClO <sub>4</sub> , the residue was treated as same as that of No. 1.         | 19.2          | 96  |

Be taken : 20 ng; † Mean of two determinations

により増感を図った。灰化温度は下村ら<sup>6)</sup>、Stiefel ら<sup>7)</sup>の報告があるが、乾燥 150 °C, 20 秒, 灰化 600 °C, 20 秒, 原子化 10 V (推定 2500 °C), 30 秒の条件で測定した。

### 3.3 抽出における諸条件の検討

2.2 のリン酸カルシウム溶液採取量を変え、ベリリウムを 20 ng 一定とし、3.1 に従ってベリリウムの抽出率を検討し、AA の添加量、液の pH、抽出回数及び試料溶液調製後の放置時間についても検討した。その結果、リン酸カルシウムが 1.0 g まで共存している場合、AA 2 ml, pH 8.5, 液量 150 ml において、試料溶液を調製後 12 時間以上放置すれば、10 ml の MIBK で 2 回抽出することにより 96 % 以上のベリリウムが回収されることが分かった。なお抽出はたとえ AA の添加量を増加しても 1 回では不十分であったので 2 回行うこととした。又、この抽出条件で、pH 6.0, 7.5 及び 8.5 でのベリリウムの回収率はそれぞれ 91 %, 89 % 及び 100 % であった。更に AA の添加後の放置時間のみを 4 時間及び 12 時間とした場合の回収率はそれぞれ 85 % 及び 100 % であった。従って以後の分析操作におけ

る抽出条件を 3.1 のように決定した。

### 3.4 ポリリン酸の分解

試料はたとえ、プラズマアッシャーを用いて灰化した場合でも、ベリリウムの抽出率は低い。従って、試料中のリン酸塩はこの場合でも、通常の灰化法と同様にポリリン酸塩となるものと考えられる。著者らはポリリン酸塩の分解法として 1) 超音波照射による分解法、2) 過塩素酸溶液の加熱による分解法、の両者についてピロリン酸を対象として比較検討した。

ピロリン酸の塩酸又は過塩素酸溶液の超音波分解法の結果及びピロリン酸の過塩素酸溶液の加熱による分解法の結果をそれぞれ Table 1 及び Table 2 に示した。超音波分解法ではピロリン酸 0.8 g は、試料溶液 10 ml 中塩酸 2.0 ml, 又は試料溶液 25 ml 中過塩素酸 2.0 ml の存在において 2 時間照射により分解され、ベリリウムはほぼ完全に抽出できるようになる。塩酸の濃度を高くすることにより照射時間は 1.5 時間に短縮できる。過塩素酸は塩酸に比べてより小さい濃度で塩酸の場合と同じ効果が得られる。

ピロリン酸量が増加した場合には、酸の添加量を増加

するか, 照射時間を長くする必要があることが分かる. 本実験で用いた装置では超音波発生 of 出力を増すことができなかったが, 出力を大きくすれば分解の効果を高めることができるかもしれない.

Table 2 に示した過塩素酸による加熱分解法では No. 1 の条件で, ベリリウムの回収率は 88 % であるが, 過塩素酸 2 ml を加えてほとんど乾固するまで濃縮した場合には回収率は 93 % にまで増加する. しかし, No. 1 と No. 2 を併用した No. 3 の条件では回収率は 96 % となり, この方法がポリリン酸の分解に最も効果があった.

ベリリウムの含有量の低い豚の骨の灰化試料 (Table 4, No. 2) について過塩素酸分解の効果をみた (Table 3). 試料を含んだ過塩素酸溶液を乾固近くまで濃縮し白煙の発生をみた No. 1, No. 2 でのベリリウムの添加回収率は 92 %, 95 % であったが, 試料を比較的うすい過塩素酸に加熱溶解-濃縮するのみで白煙の発生をみない No. 3, No. 4 での添加回収率はそれぞれ 88 %, 21 % と低い. 同じ試料を用いて同様に白煙発生処理を行った場合, 行わなかった場合について超音波照射処理を行いベリリウムの回収率を求めた結果はほぼ Table 3 と同様であった. 従って実試料の分解に際しては過塩素酸溶液を, 一度, ほぼ乾固の状態にする必要があることが分かった.

Table 3 Effect of treatment of bone ash on the recovery of beryllium

| No. | Bone ash† (g) | Be taken (ng) | Be found (ng) | Recovery (%) |
|-----|---------------|---------------|---------------|--------------|
| 1   | 0.300         | 20.0          | 17.2, 19.8    | 92           |
| 2   | 1.000         | "             | 20.1, 18.5    | 95           |
| 3   | 0.300         | "             | 16.8, 18.8    | 88           |
| 4   | 1.000         | 4.0           | 0.9, 0.9      | 21           |

† Pork bone ash (0.25 ppb Be) was used. No. 1, No. 2: Samples were decomposed with 2 ml of  $\text{HClO}_4$ , and then heated until almost dryness. To the residues 2 ml of  $\text{HClO}_4$  and 50 ml of water were added, and the solutions were evaporated until half the initial volume. No. 3, No. 4: Samples were treated in the same manner except that fuming with  $\text{HClO}_4$  was neglected.

これらの諸検討の結果, 分析法を 3.1 に示すように決定した. なお, ポリリン酸の分解には過塩素酸による処理を行った後更に 60 分の超音波処理を行ったほうが結果の変動が小さく, 又回収率もよいようである. 又, 実試料の分解に塩酸を用いる方法は, 褐色の不溶解分が残り, この中のベリリウムの量は無視できないため採用できない.

### 3.5 実試料の測定

豚及び牛の骨について 3.1 の操作法に従って分析した結果はそれぞれ Table 4 及び Table 5 に示すようにほぼ満足できるものであった. なお空試験値は Table 5 に示すように 5 回の平均値として 0.20 ng であった.

Table 4 Analytical result for beryllium in pork bone

| Sample No. | Be added (ng) | Be found (ng) |
|------------|---------------|---------------|
| 1†         | nil           | 1.0           |
| "          | 2.0           | 3.1           |
| 2          | nil           | 0.2, 0.3      |
| "          | 2.0           | 2.0, 2.1      |

† Sample taken : 1.000 g

Table 5 Analytical result for beryllium in beef cattle bone

| Sample No. | Be added (ng) | Be found (ng) |                |
|------------|---------------|---------------|----------------|
| 1          | nil           | 0.6           | 0.6            |
|            |               | 0.7           | 0.6 (Mean 0.6) |
|            |               | 2.7           | 2.8            |
| 2          | 2.0           | 2.6           | 3.1 (Mean 2.8) |
|            |               | 0.9           | 0.9            |
|            |               | 1.2           | 1.0 (Mean 1.0) |
| 3          | 2.0           | 2.9           | 3.2            |
|            |               | 2.7           | 3.0 (Mean 3.0) |
|            |               | 0.3           | 0.2            |
| 4          | nil           | 0.3           | 0.4 (Mean 0.3) |
|            |               | 0.4           | 0.4            |
|            |               | 2.3           | 2.2            |
|            | 2.0           | 2.2           | 2.4 (Mean 2.3) |

Blank value : 0.1<sub>8</sub>, 0.2<sub>0</sub>, 0.2<sub>2</sub>, 0.2<sub>1</sub>, 0.2<sub>0</sub> (Mean 0.2<sub>0</sub>); Sample taken : 1.000 g

使用した日立製 308 型では最高の原子化温度が 2500 °C 程度である. 測定溶液中にリン酸カルシウムが残存する場合には測定を重ねるに従ってグラファイトアトマイザー中に蓄積され, 測定精度を低下させ, 最終的にはベリリウムの注入量に比例した吸光値が得られなくなる. 従って測定に際しては適宜にその最高温度によるクリーニング処理を行わなければならない.

### 3.6 試料の採取法と採取部位について

試料の採取法はこれまで 2.3 に従って行ったが, その際, A 部 (Fig. 2) では中心部の髄質を取り除くことにより, ほとんど密質のみが得られる. 海綿質又は海綿質を含んだ部分では厳密に骨質のみを採取することはできない. 石野ら<sup>8)</sup>は豚の下がく枝を試料とする際, 生

Table 6 Relationship between sampling position on pork thighbone and beryllium content

| Sampling position | Sample taken (g) | Dried weight after ether refluxing (g) | Ash (g)                  | Be determined (ng) |                   |
|-------------------|------------------|----------------------------------------|--------------------------|--------------------|-------------------|
|                   |                  |                                        |                          | In ash (g)         | In raw sample (g) |
| A                 | 2.79             | 2.24                                   | 1.56<br>(69.7)† (55.9)†† | 0.5                | 0.3               |
| B                 | 3.89             | 2.19                                   | 1.51<br>(68.8)† (38.8)†† | 0.6                | 0.3               |
| B                 | 6.57             | 4.55                                   | 3.11<br>(68.4)† (47.3)†† | 0.7                | 0.4               |
| B                 | 4.90             | 3.37                                   | 2.36<br>(70.3)† (48.2)†† | 1.0                | 0.5               |
| C                 | 5.67             | 2.46                                   | 1.58<br>(64.3)† (27.9)†† | 2.3                | 0.6               |
| C                 | 9.49             | 4.30                                   | 2.71<br>(63.1)† (28.6)†† | 2.1                | 0.6               |

† Ash % per ether refluxed and dried sample; †† Ash % per raw sample

試料をエーテルで (2~3) 時間還流し, 110 °C で乾燥したものを採取した. この方法は海綿質中に含まれる脂肪分などを除き, 骨質のみを採取する目的には有効であろうと考えたので, 1 本の大たい骨について各部より試料を採取し, 生試料の採取量, エーテルで 3 時間還流し, 常温乾燥した後のひょう量値, 更に 110 °C で乾燥後のひょう量値, 500 °C 以下で灰化後の灰分量などを求め, ベリリウムの分析値と比較した. Table 6 に示すようにエーテル還流後 110 °C で乾燥した試料中の灰分は, (67.4±3.0)% とほぼ一定値が得られるが, 灰分 1 g 当たりのベリリウムの分析値は明らかに骨の末端部ほど高くなり, 0.50 ng (A 部)~2.25 ng (C 部) と大きな差となった. 一方, 生試料 1 g 当たりの分析値は (0.28~0.62) ng となり, 部位による開きは小さい. このことは骨質中のベリリウムの含有量と, 海綿質中に含まれる髄質, 血液などの中のベリリウム含有量の差が大きいことを示すものと考えられる.

(1979 年 10 月, 日本分析化学会第 28 年会及び 1980 年 5 月, 第 42 回分析化学討論会において一部発表)

## 文 献

- 1) T.Y. Toribara, P.S. Chen : *Anal. Chem.*, **24**, 541 (1952).
- 2) T.Y. Toribara, R.E. Cherman : *Anal. Chem.*, **25**, 1595 (1953).
- 3) C.W. Sill, G.R. Willis : *Anal. Chem.*, **31**, 598 (1959).
- 4) 重松恒信, 田伏正之, 磯島文雄 : 分化, **11**, 752 (1962).
- 5) 中島良三 : 分化, **27**, 185 (1978).

- 6) 下村 滋, 森田秀芳, 久保正則 : 分化, **25**, 539 (1976).
- 7) T.H. Stiefel, K. Schulze, G. Tölg, H. Zorn : *Anal. Chim. Acta*, **87**, 67 (1976).
- 8) 石野二三枝, 松前久子, 柴田寛一, 有賀那加夫, 五島文韶 : 分化, **27**, 232 (1978).

☆

**Determination of beryllium in bone by graphite furnace atomic absorption spectrometry; Application of ultrasonic radiation decomposition of polymerized phosphates.** Ryoza NAKASHIMA, Eijiro KAMATA, and Shozo SHIBATA (Government Industrial Research Institute, Nagoya, 1, Hirate-machi, Kita-ku, Nagoya-shi, Aichi)

On the extraction of a ng range of beryllium as an acetylacetonate from the solution of bone ash, the interference of polymerized phosphates, which are produced in an ashing procedure, has been wellknown. Sill's technique by heating with perchloric acid, and an alternative ultrasonic radiation into the sample solution of hydrochloric or perchloric acid, was studied comparatively to decompose the polymerized phosphates. The ultrasonic radiation was found to be effective, but Sill's technique of dissolution of an ashed sample with perchloric acid followed by fuming to almost dryness was necessary prior to the ultrasonic radiation procedure. The analytical procedure was proposed with some modifications of Sill's technique. One gram of sample ashed in a muffle furnace below 500 °C was digested with 2 ml of perchloric acid and fumed up to almost dryness. To the residue, 2 ml of perchloric acid and 50 ml of water were added and the solution was evaporated on a hot plate to half the initial volume. The solution was furthermore treated with ultrasonic radiation for an hour. To the solution, 20 ml of 0.5 M EDTA, 2 ml of acetylacetone and 80 ml of water were added and adjusted pH to 8.5. After standing for overnight, the solution was transferred to a 200 ml separatory funnel and diluted to 150 ml. Beryllium was extracted two times with 10 ml of MIBK. The collected organic layer was washed five times with each 5 ml of water, and was backextracted with 5 ml of 2 M hydrochloric acid by shaking for 5 min. Standard addition method was used for the determination. The analytical results of pork and beef cattle bone were in a range from (0.2~1.0) ng per 1 g of ashed samples. The blank value in the procedure was found to be 0.2 ng. The sampling techniques and the sampling positions on a pork thighbone were also discussed in relation to the analytical values.

(Received Jan. 20, 1983)

## Keyword phrases

ultrasonic radiation decomposition of polymerized phosphate; beryllium in bone; graphite furnace atomic absorption.