

固体試料の原子吸光直接定量法における生物粉末試料の ための検量線の新しい作成方法

——固体試料のための標準添加法——

厚谷 郁夫[®], 南 尚嗣, 張 強斌*

(1992年9月24日受理)

ミニチュアカップ固体試料の直接定量法では検量線作成方法が最も重要な問題の一つであった。この問題を解決するため原子吸光法による生物粉末試料中の微量元素の直接定量のための検量線の新しい作成方法として固体試料のための標準添加法を考案した。本法を生物試料中の ppm レベルのニッケル、コバルト、銅、マンガンなどに適用した場合、正確度の高い結果が得られることを明らかにした。又、sub-ppm レベルの前灰化濃縮を必要とする生物試料に対しては標準物質の選択の問題があったが、固体試料のための標準添加法を適用することによって良好な結果が得られることを明らかにした。

1 緒 言

固体粉末試料の原子吸光直接定量法は試料の溶解・希釈を必要としないので高感度分析が可能であること、高感度分析において問題となる試薬などからのコンタミネーションも最小限に抑えられること、分析時間が著しく短縮されることなどの利点を有するため、わが国においても最近急速に発展している^{1)~6)}。一方、原子吸光分析法による固体粉末試料の直接定量では①バックグラウンド補正をどうするか、②粉末試料のひょう取・導入・測定後の取り出しを実用化できるか、③標準物質の選択をどうするか、④粉末試料の濃縮・希釈は可能か、など、いくつかの本質的な問題が指摘されてきた。バックグラウンド補正については小泉ら⁷⁾によるゼーマン効果を利用する方法、その他重水ランプ補正や Smith-Hieftje による方法⁸⁾などで解決されたほか、固体粉末試料の導入・取り出しは Price⁹⁾らが皿型グラファイトカップを発表した後、Kürfürst¹⁰⁾がプラットフォームポート、著者ら¹¹⁾¹²⁾がミニチュアカップを提案し、実用化されるにいたった。特にミニチュアカップ方式は試料ひょう取・原子化部への導入、取り出しは上部から行う構造になっているので matrix-modification が容易に行い得る¹³⁾、このことは固体試料に標準溶液を添加するかたちの標準添加法が可能であることを意味して

いる。

一方、③“標準物質の選択の問題”のみはいまだに解決されず、検量線の作成方法に関しては多くの検討を必要としている。

著者らは原子吸光法による生物粉末試料の直接定量における標準物質として、NIST あるいは NIES 標準物質の一つを選択することによって良好な結果が得られること¹⁴⁾、又、鉛¹²⁾、カドミウム¹⁵⁾などの元素に対しては水溶液（硝酸微酸性）標準試料を適用し得るほか、銅、マンガン、コバルト、ニッケルなどにはマグネシウム-8-キノリノール共沈合成標準試料¹⁶⁾の適用が可能であることを報告してきた。

又④“生物粉末試料の濃縮”については前灰化法³⁾が有用であることを報告してきたが、この場合も標準物質の選択が重要な問題となる。

本報では検量線の作成方法として、ミニチュアカップ方式の利点を活用し、生物粉末試料及び前灰化した試料に対して溶液標準試料による標準添加法の適用の可能性について検討した。固体試料の標準添加法については、従来報告されている Eames ら¹⁷⁾の方法があるが、ここに提案する新しい作成方法がより優れていると考えられるので報告する。

2 実 験

2.1 装置及び器具

固体粉末試料の直接定量には日立製偏光ゼーマン原子

* 北見工業大学一般教育化学教室: 090 北海道北見市公園町 165

吸光装置 Z-8000 型及び付属のデータプロセッサ AA 型を用いた。光源は日立製単元素中空陰極ランプ HCL-3 型を、シースガスには高純度アルゴンを用いた。生物試料のひょう量には Mettler 製の電子天びん M-3 型 (読取限度: 1.0 μg , 最大ひょう量: 2.9 g) を用いた。粉末試料の採取用のスプーン及びミニカップ取り扱用のピンセットなどはいずれもタンタル製のものを自作した。

標準溶液の添加,あるいは注入には Eppendorf 製のマイクロピペット 4700 型 (固定容量) を使用した。

生物粉末試料の前灰化には,磁製ルツボ及び Yamato 製の Muffle 炉 FP. 31 型を用いた。この場合,試料のひょう量には Mettler 製の電子天びん AE-200 型 (読取限度: 100 μg) を用いた。

2.2 標準試料及び試薬

本報で用いた NIES, NIST などの生物標準試料は 85°C, 4 時間乾燥後,シリカゲルを乾燥剤としたデシケーターに保存して分析に供した。

標準添加のための金属標準液は,和光純薬工業の原子吸光分析用金属標準液 (1000 ppm) を希釈して用いた。

試薬類は和光純薬工業の試薬特級品及び精密分析用を用いた。純水は, Millipore Milli-Q システムにより製造した純水を用いた。

2.3 分析操作

2.3.1 生物粉末試料の前灰化濃縮操作

生物粉末試料 (0.5~1.0 g) をあらかじめひょう量した磁製のつぼにはかり取り, Muffle 炉で一定の温度 (600~800°C) で 30 分灰化を行う。灰化前と灰化後の重量差から濃縮倍率を求める。灰化した試料はデシケーターに保存して原子吸光直接定量に供した。この灰化操作は粉末試料の濃縮のため行う操作であり,原子吸光測定の際の乾燥,灰化,原子化の灰化とは異なることから,前灰化濃縮と呼ぶことにした。

2.3.2 原子吸光直接定量操作

ミニカップは使用前にから焼きし,汚染のないことを確かめた後,ひょう量して,タンタル製のスプーンを用いて粉末試料 (0.1~2.0 mg) を採取し再度ひょう量する。このときの重量差が試料採取重量である。これを自作のピンセットを用いて,カップ型黒鉛炉へ装てんする。次に,マイクロピペットを用いて標準溶液 5 μl をミニカップへ添加後, Table 1 に示した条件で測定を行った。吸光信号はピーク面積法を用いた。測定回数は 5~7 回とし,これ

Table 1 Instrumental conditions for Hitachi Z-AAS

Element	Co	Ni	Mn	Cu
Wavelength/nm	240.7	323.3	279.5	324.8
Slit width/nm	0.8	0.8	0.8	0.8
H.C.L. current/mA	10	10	7.5	7.5
Ar carrier gas/ml min ⁻¹	200	200	200	200
Ar interrupted gas/ml min ⁻¹	30	30	30	30
Drying	100~150°C, 30 s		100~150°C, 30 s	
Ashing	1200°C, 30 s		800°C, 30 s	
Atomization	2600°C, 15 s		2600°C, 15 s	

らの測定結果より,粉末試料 1 mg 当たりの吸光度を求め,ここに提案する固体試料のための標準添加法により定量する。

3 結果及び考察

3.1 固体試料直接定量のための新しい標準添加法

従来の原子吸光法で溶液試料に対して標準添加法を適用する場合は,試料溶液採取量を一定にすることが可能であり,標準溶液を試料溶液に添加し,かき混ぜることによって測定試料溶液は均一となるので,ほぼ理想的なマトリックス・マッチング法による検量線を作成したことと同じになる。しかし,溶液試料における標準添加法といえども標準溶液添加量の増大,すなわち目的元素の濃度の増大と共にわずかながら吸光度の減少が生じる場合がある。このような場合,検量線は一見良好な直線性を示しているように見えてもこの配が減少するため,標準添加法では外挿法を適用し,希釈倍率を乗じて濃度を決定するのでこの配変化による誤差は拡大され,定量結果の正確度に影響を与える場合がしばしばある¹⁸⁾。

一方,粉末試料の直接定量において標準添加法を適用する場合には,固体粉末試料を毎回同じ量採取するのは困難であり,又標準添加法の適用のため溶液標準試料を添加した場合固・液混合試料となり,均一な状態にはならないので,溶液試料測定の場合とは異なる幾つかの問題が生ずる。

この問題については既に Eames らの報告¹⁷⁾があるが, Eames らの方法を適用した場合どのような問題が生じるかを具体的に示すと同時に,著者らの方法はそれらの問題の解決に役立つことを次に示す。

ここでは典型例として NIES Tea Leaves 中のニッケルの定量例を用いて固体試料のための標準添加法について述べる。上に述べたように粉末試料を毎回同じ量採取することは困難であるから標準溶液一定量の添加を前提にし、粉末試料重量と吸光度の関係をプロットする。

固体試料のための新しい標準添加法では Fig. 1 に示すように標準添加溶液の濃度を 3 段階異ならせ、それぞれについて粉末試料量と吸光度の関係をプロットし、それぞれの回帰直線を求めることによって line II, III, IV を得る。次にそれらのこう配と切片からそれぞれ粉末試料 1 mg 相当の吸光度を求めプロットすると Fig. 2 のようになる。Fig. 2 の切片は純水 (5 μ l) を添加して求めた粉末試料 1 mg 相当の吸光度である。従って Fig. 2 は粉末試料 1 mg 相当に規格化した吸光度 3 点から得られた標準添加法に基づく検量線であるため、個々の line I~IV のこう配の微小変化は 3 点による平均値となるので定量結果に大きく影響しないし、Fig. 2 の直線から 1 点がずれた場合、その評価が可能となり再検討が容易である。それゆえ、以下ここに提案した固体試料のための標準添加法を 3 点評価標準添加法と呼ぶことにする。このようにして Fig. 2 で得られた検量線を用いて求められた定量結果を Table 2 に示すが、本法の値と保証値は良好な一致を示していると言える。

又 NIES Peppercorn 中のニッケルについて検討した場合もほぼ同じような結果になったので、定量結果のみ Table 2 に併せて示す。

さて、Eames らの方法をここに提案した 3 点評価標準添加法と比較するならば、Eames らの方法は 1 点評価標準添加法と呼べるもので、Fig. 1 を例にとれば line I と line II のこう配が等しくなることが前提となる。多くの場合、測定誤差のため line I, II (III, IV) のこう配が等しくならぬことが多く、Eames らの標準添加法では line II のわずかなこう配の変化が直接的に定量結果に影響してくるのは当然である。ここで Fig. 1 の line I から得られる粉末試料 1 mg 当たりの吸光度は Fig. 2 の縦軸の切片であり、この点を用いて 3 点としても良いが、ここでは三つの異なった濃度の標準溶液を添加して得られた 3 点から検量線を得るほうが標準溶液添加による規格化という観点からより正確度を増すと考えられる。もちろん評価点の数が多いほうが正確度を増すのは当然であるが最低 3 点とれば正確度が著しく良好となることが実験結果からも明らかとなったし、原子吸光法の検量線の定量範囲から考えても最適と考えられる。

又 Fig. 1 における line II (III, IV) の切片吸光度

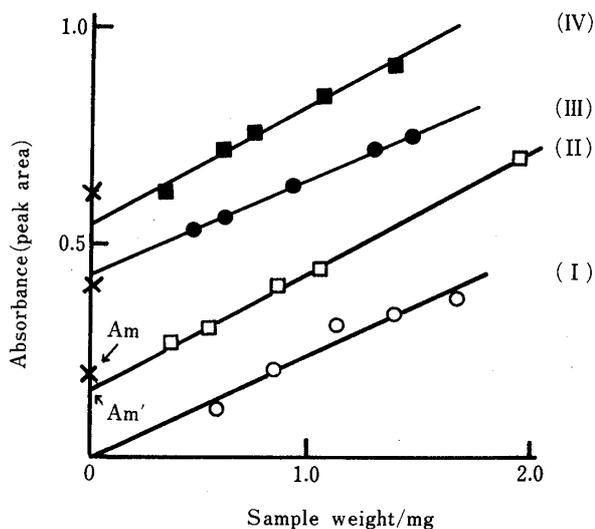


Fig. 1 Relationship between nickel absorbance and sample weight

Sample: NIES Tea Leaves; Line I: 5 μ l of pure water added; Am: nickel standard solution only, 5 ng, 10 ng and 15 ng of nickel added respectively; Line II, III and IV: 5 ng, 10 ng and 15 ng of nickel added to powdered NIES Tea Leaves respectively

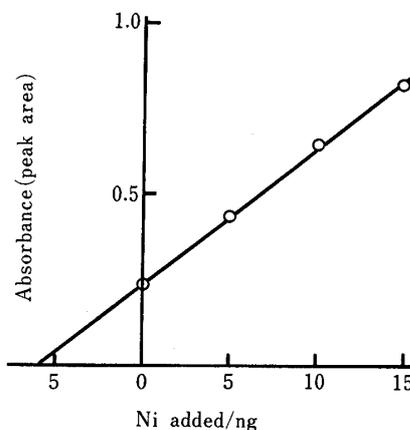


Fig. 2 Calibration curve for nickel by standard addition method for solid sampling technique

Am' は標準溶液のみを測定した場合の吸光度 Am をとるのでは意味がなく、標準溶液を添加した粉末試料について、粉末試料量と吸光度の関係をプロットし、その line II (III, IV) を外挿した値 Am' をとることによって、厳密な意味では多少異なるが、マトリックス・マッチング法と同様の意味、すなわち標準添加法の意味をもつものと考えられる。

ここで、すべて粉末試料 1 mg の吸光度に規格化した

Table 2 Analytical results for nickel in NIES Tea Leaves and Pepperbush

Sample	Ni added/ ng	Factors ^{†)}		Eames method/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Proposed method/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Certified value/ $\mu\text{g g}^{-1}$
		a	b			
NIES	0	0.2359				
Tea Leaves	5	0.2766	0.1566	8.8	6.1±0.3	6.5±0.3
	10	0.2229	0.4241	5.3		
	15	0.2791	0.5396	7.8		
NIES	0	0.3132				
Pepperbush	5	0.3215	0.1862	8.6	9.3±0.7	8.7±0.6
	10	0.2943	0.4075	7.2		
	15	0.3159	0.5171	9.2		

† Abs. = $a \times W + b$, a: abs. mg^{-1} , W: sample weight (mg)

Table 3 Analytical results for nickel in NIST Citrus Leaves and BOWEN Kale by the pre-ashing method

Sample	Ni added/ ng	Factors ^{a)}		Eames method/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Proposed method/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Certified value/ $\mu\text{g g}^{-1}$
		a	b			
NIST	0	0.3054				
Citrus Leaves ^{b)}	5	0.2446	0.2796	0.5	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.3
	10	0.2252	0.5057	0.5		
	15	0.3031	0.6875	0.8		
BOWEN	0	0.2327				
Kale ^{c)}	5	0.1269	0.3231	0.34	0.87±0.06	0.895±0.138
	10	0.1795	0.4413	0.70		
	15	0.1593	0.5913	0.70		

a) Abs. = $a \times W + b$, a: abs. mg^{-1} , W: sample weight (mg); b) concentration factor: 8.5; c) concentration factor: 5.8

のは回帰直線の測定範囲の中間値に近い値となるためである¹⁹⁾.

3・1・1 NIST Citrus Leaves, BOWEN Kale 中の sub-ppm レベルのニッケルの定量 固体試料の原子吸光法による sub-ppm レベルのニッケルの定量においては既に報告したように電気炉による前灰化濃縮法が有効であり、生物試料中のカリウム、マグネシウムなどの濃度が分かれば濃縮倍率も推定し得ることを明らかにしてきた³⁾. そこで NIST Citrus Leaves, BOWEN Kale 中の sub-ppm レベルのニッケルの定量においては前灰化濃縮法を用い、前灰化濃縮した粉末試料の直接定量に対して、3点評価標準添加法を適用することを試みた。定量結果は Table 3 に示すように本法を適用することによって良好な結果が得られることが明らかとなった。

3・1・2 NIES Chlorella 中のコバルト及び銅, NIST Orchard Leaves 中のコバルトの定量 NIES Chlorella 中のコバルトは原子吸光直接定量法では、定

量限界に近い濃度であるが、この微量コバルトの直接定量へ適用できるかどうか試みた。定量結果は Table 4 に示すように3点評価標準添加法で良好な結果が得られた。又銅についても同様な結果が得られたので合わせて示した。NIST Orchard Leaves 中のコバルトは sub-ppm レベルであるゆえ前灰化濃縮を必要とするがニッケルの場合と同様 Table 4 に示すような良好な結果が得られた。

3・1・3 NIST Non-fat Milk Powder 中の sub-ppm レベルのマンガンの定量 生物試料中のマンガン含有量は通常 ppm レベルのものがほとんどであり、標準物質として NIST, NIES 標準試料あるいはマグネシウム-8-キノリノール共沈合成標準試料を使用した場合でも良好な結果が得られることは既に報告してきた¹⁶⁾. しかし、sub-ppm レベルのものも少なくないと考えられる。ここでは一例として NIST Non-fat Milk Powder 中の sub-ppm レベルのマンガンについて検討した。こ

Table 4 Analytical results for cobalt and copper in NIES Chlorella and NIST Orchard Leaves

Sample	Element added/ ng	Factors ^{a)}		Eames method/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Proposed method/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Certified value/ $\mu\text{g g}^{-1}$
		a	b			
NIES Chlorella	Cu 0	0.1804				
	2.5	0.1577	0.1335	3.0	3.6 \pm 0.3	3.5 \pm 0.3
	5.0	0.1596	0.2678	3.0		
	7.5	0.1451	0.3973	2.7		
Co 0	0.0687					
NIST Orchard Leaves ^{b)}	Co 0	0.1483				
	1.0	0.1427	0.0958	0.14	0.15 \pm 0.01	0.160 \pm 0.034
	2.0	0.1502	0.1901	0.16		
	5.0	0.0219	0.3885	0.28		
7.5	0.0237	0.5185	0.34			

a) Abs. = $a \times W + b$, a : abs. mg^{-1} , W : sample weight (mg); b) by the pre-ashing method (concentration factor: 10.6)

Table 5 Analytical results for manganese in NIST Non-fat Milk Powder by the pre-ashing method

Sample	Mn added/ ng	Factors ^{a)}		Eames method/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Proposed method/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Certified value/ $\mu\text{g g}^{-1}$
		a	b			
NIST Non-fat Milk Powder ^{b)}	0	0.8559				
	1.0	0.7468	0.4664	0.13	0.22 \pm 0.01	0.26 \pm 0.06
	2.0	0.7124	0.7796	0.15		
	3.0	0.8723	0.9802	0.21		

a) Abs. = $a \times W + b$, a : abs. mg^{-1} , W : sample weight (mg); b) concentration factor: 12.5

の場合も先に述べたように試料は前灰化法で濃縮し、直接定量に供した。定量結果は Table 5 に示すように、sub-ppm レベルのマンガンの定量の場合保証値に比べて多少低い結果ではあるがほぼ満足し得る定量結果と考えられる。

黒鉛炉原子吸光法による固体試料の直接定量において最も本質的な問題であったのは検量線の作成方法の確立であった。本報ではミニチュアカップ/ゼーマン原子吸光法による生物粉末試料の直接定量のための検量線の作成方法として 3 点評価標準添加法が信頼のおける方法であることを明らかにした。

従来報告してきた、NIES, NIST などの標準試料は第二次標準であるし、8-キノリノール-マグネシウム共沈合成標準試料は目的元素が 100% 共沈することが前提になるなどの限界があり一長一短であったが、3 点評価標準添加法はこれらの欠点を補いつつ正確度の高い定量法として評価し得るものと考えられる。

本研究を行うに当たり、黒鉛ミニチュアカップの製作を担当して頂いた本学機械工学科阿部 清氏に深謝いたします。又本研究は科学研究費、一般研究 C (課題番号: 03640483) の補助のもとに行ったものであります。

(1992 年 5 月, 第 53 回分析化学討論会)
において一部発表

文 献

- 1) I. Atsuya: "Biological Trace Element Research, Multi-disciplinary Perspectives" ACS Symposium Series **445**, 196 (1991).
- 2) I. Atsuya, K. Itoh, K. Aryu: *Pure Appl. Chem.*, **63**, 1221 (1991).
- 3) I. Atsuya, K. Aryu, Q. Zhang: *Anal. Sci.*, **8**, 433 (1992).
- 4) 越野幸広, 生川 章: *分析化学*, **40**, 89 (1991).
- 5) 中村利廣, 笹川亮磨, 伊藤 純: *分析化学*, **41**, 89 (1992).
- 6) Y. Koshino, A. Narukawa: *Analyst (London)*, **117**, 967 (1992).
- 7) H. Koizumi, K. Yasuta: *Anal. Chem.*, **47**, 1679 (1975).

- 8) S. B. Smith, J. R. Hieftje, G. M. Hieftje: *Appl. Spectrosc.*, **37**, 419 (1983).
- 9) W. J. Price, T. C. Dymott, P. J. Whiteside: *Spectrochim. Acta*, **35B**, 3 (1980).
- 10) U. Kürfurst: *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **316**, 1 (1983).
- 11) I. Atsuya, K. Itoh: *Spectrochim. Acta*, **38B**, 1259 (1980).
- 12) 厚谷郁夫, 伊藤好二: 分析化学, **31**, 708 (1982).
- 13) I. Atsuya, K. Itoh, K. Akatsuka, K. Jin: *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **326**, 53 (1987).
- 14) I. Atsuya, K. Itoh, K. Akatsuka: *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **328**, 338 (1987).
- 15) 厚谷郁夫, 伊藤好二: 分析化学, **31**, 713 (1982).
- 16) K. Akatsuka, I. Atsuya: *Anal. Chem.*, **61**, 216 (1989).
- 17) J. C. Eames, J. P. Matousek: *Anal. Chem.*, **52**, 1248 (1980).
- 18) 保田和雄: “原子吸光分析の実際”, p. 89 (1980), (講談社サイエンティフィック).
- 19) 竹中治夫, 藤原 洋, 福田秀雄, 益子 安, 細谷昇: “分析のための新技術”, p. 101 (1960), (共立出版).



A new preparation method of calibration graphs for direct analysis of powdered biological samples by solid sampling atomic absorption spectrometry; Standard addition method for solid sampling technique. Ikuo ATSUYA, Hirotsugu MINAMI and Qiangbin ZHANG (Kitami Institute of Technology, 165, Koen-cho, Kitami-shi, Hokkaido 090)

A method for the preparation of calibration graphs has been one of the most important problems in solid sampling technique with atomic absorption spectrometry. In order to dissolve this problem, the standard addition method for solid sampling technique is proposed for the direct determination of nickel, cobalt, copper and manganese at the ppm levels in powdered biological samples by atomic absorption spectrometry. Accurate analytical results have been obtained by using a miniature cup with solid sampling. This method is also applied to those at the sub-ppm levels in some powdered biological samples, which should be concentrated by a pre-ashing method with a conventional electrothermal Muffle furnace. For these pre-ashed powdered samples it was also difficult to prepare the calibration graphs. However it becomes possible to obtain good analytical results when the calibration graphs are prepared by the proposed standard addition method for solid sampling technique.

(Received September 24, 1992)

Keyword phrases

preparation method of calibration graphs; atomic absorption spectrometry with solid sampling; direct analysis of powdered biological samples; standard addition method for solid sampling technique.