

## ノ ー ト

誘導結合プラズマ発光分析法による貝の硬組織中マグネシウム定量  
への溶媒抽出法の適用福井 博章<sup>1</sup>, 藤野 治<sup>2</sup>, 梅谷 重夫<sup>3</sup>Application of solvent extraction method to the determination of  
magnesium in hard tissues of shellfish by ICP-AESHiroaki FUKUI<sup>1</sup>, Osamu FUJINO<sup>2</sup> and Shigeo UMETANI<sup>3</sup><sup>1</sup> Chemical Products Research Laboratories Wako Pure Chemical Industries, LTD, 1633, Matoba, Kawagoe-shi, Saitama 350-1101<sup>2</sup> Research Institute for Science and Technology, Kinki University, 3-4-1, Kowakae, Higashi-Osaka-shi, Osaka 577-8502<sup>3</sup> Institute for Chemical Research, Kyoto University, Gokasho, Uji-shi, Kyoto 611-0011

(Received 14 April 2004, Accepted 9 July 2004)

The magnesium in hard tissues (shell and pearl) of shellfish inhabiting freshwater and sea water was determined by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) after solvent extraction separation. We examined whether ICP-AES signals for magnesium were highly suppressed, or increased by large amounts of calcium ions. Two interferences, spectral and physics, were generated by the macro-component calcium for the emission intensity of magnesium. These interferences occurred simultaneously for magnesium. In addition, the calcium of the large excess adhered to a quartz torch, and the tip minute of the torch was damaged. From these results, it became clear that it is necessary to separate magnesium from calcium prior to a measurement by ICP-AES. To eliminate this problem, we applied the solvent extraction method to separate magnesium from the interfering element, calcium. The chelating agent was easy to form the chelate with magnesium, and then a reagent that could extract the chelate from the acid solution was chosen. 1-phenyl-3-methyl-4-trifluoroacetyl-5-pyrazolone (HPMTFP) having a  $pK_a$  value of 2.56 was chosen as the extraction reagent. Also, we selected some organic solvents in which the carbon did not adhere to torch without extinguishing plasma on the extractant. The sample solutions of shell and pearl used in the present work were treated with hot concentrated nitric acid, hydrochloric acid and perchloric acid. Magnesium was extracted with 0.01 mol/l-HPMTFP in dibutyl ether at pH 4.5 in order to separate it from the interfering calcium. Magnesium was determined by ICP-AES, and direct injection of the dibutyl ether. The magnesium content in the shell and pearl was found to be 16.4 ~ 2627  $\mu\text{g/g}$ .

**Keywords** : ICP-AES; hard tissues of shellfish; solvent extraction; 1-phenyl-3-methyl-4-trifluoroacetyl-5-pyrazolone; magnesium.

## 1 緒 言

自然界には多種多量の貝類が生息し、広く分布している。これら貝は生息環境から容易にイオン類を取り込むため<sup>1)~5)</sup>、環境汚染を見いだす指標生物として注目されている。また、貝殻や真珠のような硬組織に吸収されたイオン

<sup>1</sup> 和光純薬工業株式会社化成品研究所: 350-1101 埼玉県川越市大字の場 1633

<sup>2</sup> 近畿大学理工学総合研究所: 577-8502 大阪府東大阪市小若江 3-4-1

<sup>3</sup> 京都大学化学研究所: 611-0011 京都府宇治市五ヶ庄

類は拡散速度が極めて遅く、過去の環境汚染状態を見いだす指標生物としても注目される<sup>1)</sup>。

著者らは、これら貝試料、特に硬組織中の微量元素の含有量や分布、循環挙動に関する知見を得るため、これら試料中の微量元素の高感度、高精度定量法について分析化学的基礎研究を行ってきた<sup>6)~9)</sup>。

本報は、これらの研究の一環として、貝殻や真珠中の多量成分であるカルシウムと同じ周期表2族元素に属し、生物学的にも興味を持たれるマグネシウム、ストロンチウム及びバリウム（以後カルシウムを含めた4元素をアルカリ土類元素と略記）の微量定量法について<sup>10)~12)</sup>、誘導結合プラズマ発光分析法（ICP-AES）により、検討を行った。

その結果、これら微量アルカリ土類元素はマクロ成分カルシウムにより分光及び物理干渉を受け、更に長時間、高濃度のカルシウム溶液をプラズマトーチに導入するとキャリアーガス管先端部分に付着し、プラズマフレームを不安定化するとともにトーチの損傷を早めた。

したがって、マクロ成分カルシウムとアルカリ土類元素を分離した後、ICP-AESにより測定する必要がある、ここではその前処理法に溶媒抽出法を用いることにした<sup>13)~16)</sup>。

しかし、アルカリ土類元素は化学的性質が類似しているため、これら元素間の分離は困難を伴うことが考えられたが、ここではキレート剤に1-フェニル-3-メチル-4-トリフルオロアセチル-5-ピラゾロン（HPMTEP）を用いて<sup>9)</sup>、これら元素間の抽出分離を試みた結果、貝の硬組織中マグネシウムのICP-AESにおける前分離処理法としての適用性を見いだしたので報告する。

## 2 装置、試薬及び実験操作

### 2.1 装置及び測定条件

アルカリ土類元素の測定・定量には既報のICP発光分析装置を用いた<sup>7)</sup>。マグネシウム、カルシウム、ストロンチウム及びバリウム各元素の測定波長はそれぞれ最大の発光強度を示す279.55 (II)、393.37 (II)、407.77 (II)及び455.40 nm (II)を用いた。また、キャリアーガス、補助ガスはそれぞれ0.40と0.20 l/min、プラズマガスは水溶液及び有機溶媒に対し14と18 l/min、高周波出力は1.4及び2.0 kWで測定した。

### 2.2 試薬

試薬は和光純薬製の特級や精密分析用を、またカルシウムイオン溶液はAldrich製超高純度炭酸カルシウム(99.999%)を塩酸に溶解したものを、また抽出キレート試薬であるHPMTEPは文献に従って合成した<sup>17)18)</sup>。

### 2.3 試料の分解と溶媒抽出操作

**2.3.1 分解処理** 既報の方法により分解し溶液化し

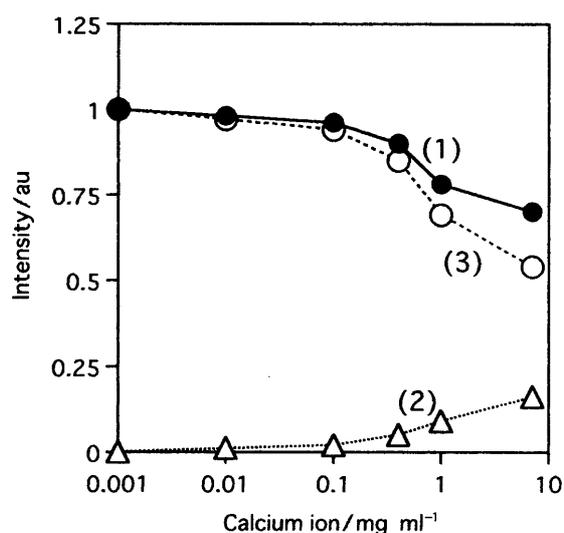


Fig. 1 Effect of calcium concentrations on magnesium emission intensity

● (1): Mg (0.1 µg/ml) + Ca; △ (2): Ca alone; ○ (3): (1)-(2)

た<sup>6)~9)</sup>。

**2.3.2 溶媒抽出操作と定量** 実試料分析を行う場合には2.3.1で分解した実試料溶液(10 mg/ml)の1~2 mlを、また検量線作成にはマグネシウムのみの0.5~10 µg/mlの標準溶液をそれぞれ1 ml分液漏斗に取り、これに1 M酢酸1 ml及び純水を約5~7 ml加え、アンモニア水でpHを4.5に調整し、水で全容を10 mlとした。これに0.01 MのHPMTEPを含むジブチルエーテル10 mlを加え、これを10分間振り混ぜた後、水相を廃棄し、有機相を10 mlの遠心分離管に移し、約10分間、有機相と水相を十分に遠心分離した後、有機相をそのままICP-AES装置に導入、マグネシウムを2.1の測定条件により、測定し、検量線法により定量した。

## 3 結果と考察

### 3.1 マグネシウム、ストロンチウム、バリウムの発光強度に対する共存マクロ成分カルシウムの影響

貝殻及び真珠中には無機主成分としてカルシウムが約35%前後と極めて多量に含有されていることから、ここでは各アルカリ土類元素の0.1 µg/mlに対しカルシウムが0.001~8 mg/ml共存した場合のマグネシウムの発光強度に対する影響について検討し、その結果をFig. 1に示した。横軸はカルシウムイオン濃度を、縦軸は発光強度を示している。

これらの結果によれば、カルシウムがマグネシウム(0.1 µg/ml)の $3 \times 10^3$ 倍(0.3 mg/ml)以上共存すると、負の干渉を示すが、この減少した発光強度はカルシウムのバックグラウンドの発光強度を含んでいる。したがって、マ

マグネシウムの発光強度からカルシウムのバックグラウンドを差し引いた正味の強度は、カルシウム濃度が  $1 \times 10^3$  倍以上共存すると、更に減少することを示している。これらの現象はストロンチウムやバリウムにおいても認められた。

以上の結果から、マグネシウムなどアルカリ土類元素は高濃度のカルシウムの分光干渉による正の干渉とプラズマへの試料導入量の減少などに起因する物理干渉による負の干渉を受けた。

更に、高濃度のカルシウム塩溶液を長時間プラズマ炎に導入すると、石英トーチへの多量のカルシウムの付着が生じ、プラズマ炎が不安定となるとともに、石英トーチのキャリアーガス管先端部分に付着した箇所が破損しやすくなった。

また、カルシウムを除いた他の共存元素によるアルカリ土類元素に対する影響については、貝殻や真珠中に共存する元素含有量をもとに<sup>2)6)</sup>、まずマグネシウム ( $0.1 \mu\text{g/ml}$ ) に対し約 100 倍量共存するナトリウムをはじめ、数 10 倍のマンガンやストロンチウム及び数倍程度の鉄、バリウム、カリウム、アルミニウムなどの影響を調べた。その結果、マグネシウム  $0.1 \mu\text{g/ml}$  に対し、これら元素が 100 倍濃度共存しても、全く干渉は見られなかった。更にマグネシウムと同濃度のストロンチウムやバリウムにおいてもこれらの共存元素の 100 倍まで検討したが、いずれの共存元素も干渉しなかった。したがって、貝殻や真珠の分解溶液中のマグネシウムなど被検アルカリ土類元素の測定・定量を行うには、マクロ成分カルシウムから分離すればよいことになり、ここでは溶媒抽出法を採用してこれらの分離について、以下詳細な検討を加えた。

### 3.2 前処理法としての溶媒抽出法の基礎検討

**3.2.1 キレート試薬の選択** カルシウムから被検アルカリ土類元素を溶媒抽出法により分離する方法を検討した。キレート剤にはアルカリ土類元素と安定なキレートを形成する O,O 配位子で大きな疎水部分を有し、また無機酸分解した酸性試料溶液から抽出可能な大きな酸解離定数 ( $\text{p}K_a = 2.73$ ) を有し、かつ合成が容易な試薬が望まれる。したがって、ここでは多くのキレート試薬の中からこれらの条件に適合した HPMTFP を用いて検討することにし、その構造式を Fig. 2 に示した<sup>9)</sup>。

#### 3.2.2 アルカリ土類元素の抽出挙動

(1) **pH と有機溶媒効果** キレート試薬と同様に溶媒抽出法において重要であるのは抽出有機溶媒である。有機溶媒を ICP-AES に導入したとき、ベンゼンやシクロヘキサンのようにプラズマ炎を消滅させることなく、また石英トーチに炭素が付着せず、かつ本研究の目的であるカルシウムと被検アルカリ土類元素との分離が可能な有機溶媒が望

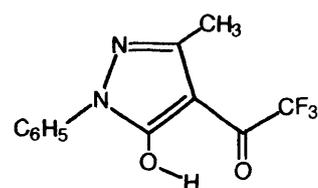


Fig. 2 1-Phenyl-3-methyl-4-trifluoroacetyl-5-pyrazolone (HPMTFP)

まれる。プラズマが消滅しない有機溶媒については既に試みられ<sup>19)</sup>、著者らも多くの検討を行った結果<sup>7)8)</sup>、有機溶媒の分子式中の炭素数が 7~10 程度の有機溶媒が上記の条件に最も適合しやすいことを見いだした。

したがって、まず ICP-AES に適用し得る種々の有機溶媒を選択しておいて、アルカリ土類元素の抽出挙動について検討することにした。

まずアルカリ土類元素の抽出挙動に対する有機溶媒効果と pH の影響について検討した。各種有機溶媒効果を比較検討するには HPMTFP の濃度を一定とする必要があった。検討予定の種々の有機溶媒の中でシクロオクタンの HPMTFP に対する溶解度が  $0.01 \text{ M}$  と最も低いことから、すべての有機溶媒中の HPMTFP 濃度を  $0.01 \text{ M}$  とした。実験操作はアルカリ土類元素 ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) の各元素単独の水溶液  $10 \text{ ml}$  に対し、pH を 1~5 の範囲で変化させ、 $0.01 \text{ M}$  HPMTFP を含む各種有機溶媒  $10 \text{ ml}$  に抽出した。このときの抽出率については抽出前の水相と抽出後の水相中のそれぞれのマグネシウム濃度を ICP-AES にて測定、定量して、前者から後者を差し引くことで有機相中濃度を求め、前者との比から抽出率 ( $E$ ) を算出した<sup>15)16)</sup>。

その結果、種々の有機溶媒のうち、デカン、キシレン、シクロオクタン、四塩化炭素及びクロロホルムではカルシウムを含め、いずれのアルカリ土類元素もほとんど抽出されなかった。

次にヘキシルアルコール、酢酸ヘキシル、メチルイソブチルケトン及びジブチルエーテルについて検討し、その結果を Fig. 3 に示した。Fig. 3 の (1) のヘキシルアルコールは、pH 4~5 において、ストロンチウムとバリウムが 10~20%、マグネシウムやカルシウムは約 70% 抽出された。これに対し、酢酸ヘキシルやメチルイソブチルケトンでは、Fig. 3 の (2) と (3) に見られるように、pH 4~5 にかけて、アルカリ土類元素はいずれもよく抽出され、アルカリ土類元素の濃縮を目的としたような場合にはこれらの有機溶媒が最適であると考えられる。

しかし、本研究の目的はカルシウムとアルカリ土類元素を分離することである。したがって、これらのデータの中でこの目的に対応し得るのは Fig. 3 の (4) のジブチルエーテルによるカルシウムとマグネシウムの抽出挙動であっ

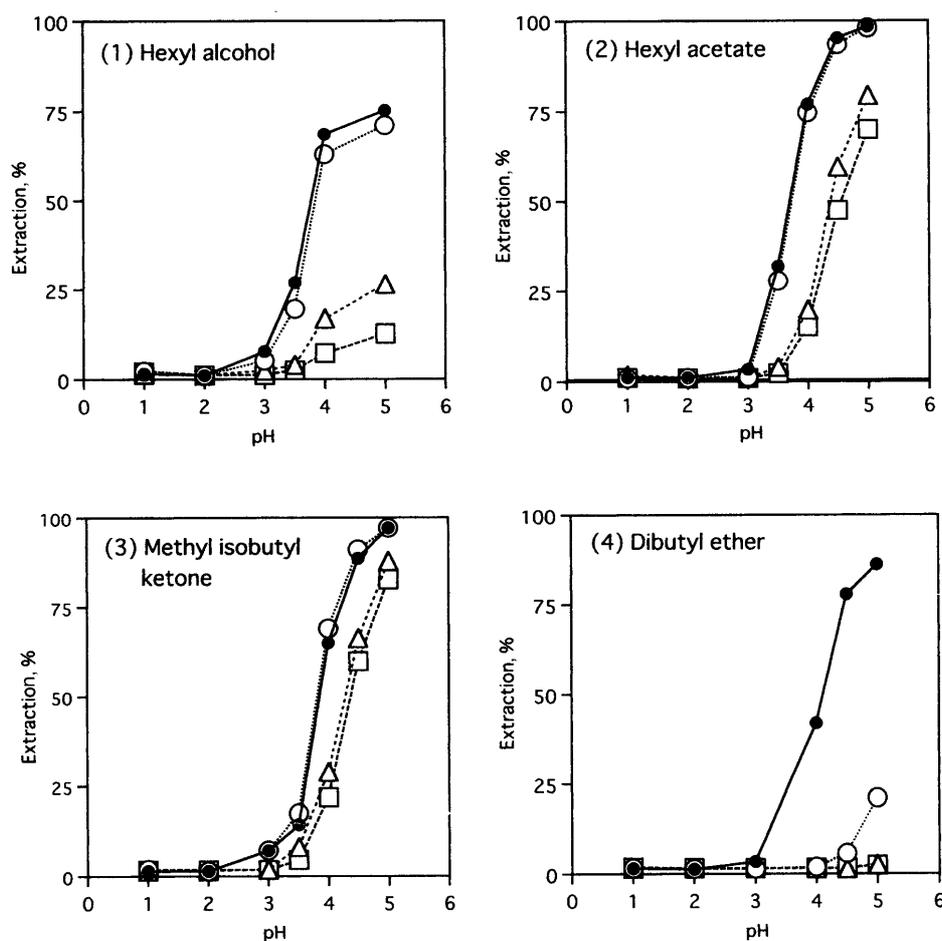


Fig. 3 Extraction efficiencies of alkali earth metal elements into various organic solvents containing 0.01 M-HPMTPF

●: Mg; ○: Ca; △: Sr; □: Ba

た。pH 4.5において、ストロンチウムやバリウムは極めて抽出されにくいですが、カルシウムは約5%抽出された。しかし、マグネシウムは約80%有機相に抽出されるのに対し、カルシウムは95%が水相に残存することから、有機相中のマグネシウムの測定において、干渉しない程度のカルシウム濃度にまで分離が可能であることが分かった。

(2) ジブチルエーテル系におけるマグネシウムの抽出挙動に対するHPMTPF濃度の影響 ジブチルエーテル系においてキレート剤HPMTPFを0.005~0.05 Mの濃度範囲で変化させたときのカルシウムとアルカリ土類元素の抽出挙動に対する結果をFig. 4の(1)~(4)に示した。カルシウムとこれら元素との分離の可能性についてはHPMTPF濃度が(1)の0.005 Mのとき、マグネシウムの抽出率は低く、逆に(2)~(4)に見られるように、0.015 M以上になるとマグネシウムの抽出率は極めて高くなるが、カルシウムも同時に抽出率が增大するため、目的とする分離能は低下した。これらの結果に対し、Fig. 3の(4)における0.01 Mは相対的に分離という点からは最適な濃度であっ

た。

なお、本溶媒抽出系におけるカルシウムからのストロンチウムやバリウムの分離については本研究で検討した抽出条件下では極めて困難であったため、以後はカルシウムとマグネシウムの分離・定量について詳細な検討を行うことにした。

3・2・3 マグネシウム抽出率に対するマクロ成分カルシウム濃度の影響 Fig. 3及び4は、カルシウムやマグネシウムなど各元素の単独溶液(10 µg/ml)を用いて検討したときの抽出挙動を示したものである。しかし、自然界の貝殻や真珠中のカルシウム対マグネシウムの含量比は $10^2 \sim 10^4$ 倍であるため、ここではマグネシウムの抽出率に対するカルシウム濃度の影響、すなわち、マグネシウム0.1 µg/mlに対し、カルシウムが0.001, 0.01, 0.1, 0.3, 0.8, 3.0及び10 mg/ml共存したときのマグネシウムの抽出率に対する影響を調べた。その結果、カルシウムが0.001~0.8 mg/mlの濃度範囲では、マグネシウムの抽出率(約80%)にはほとんど変化はなく、Fig. 3の(4)に示した

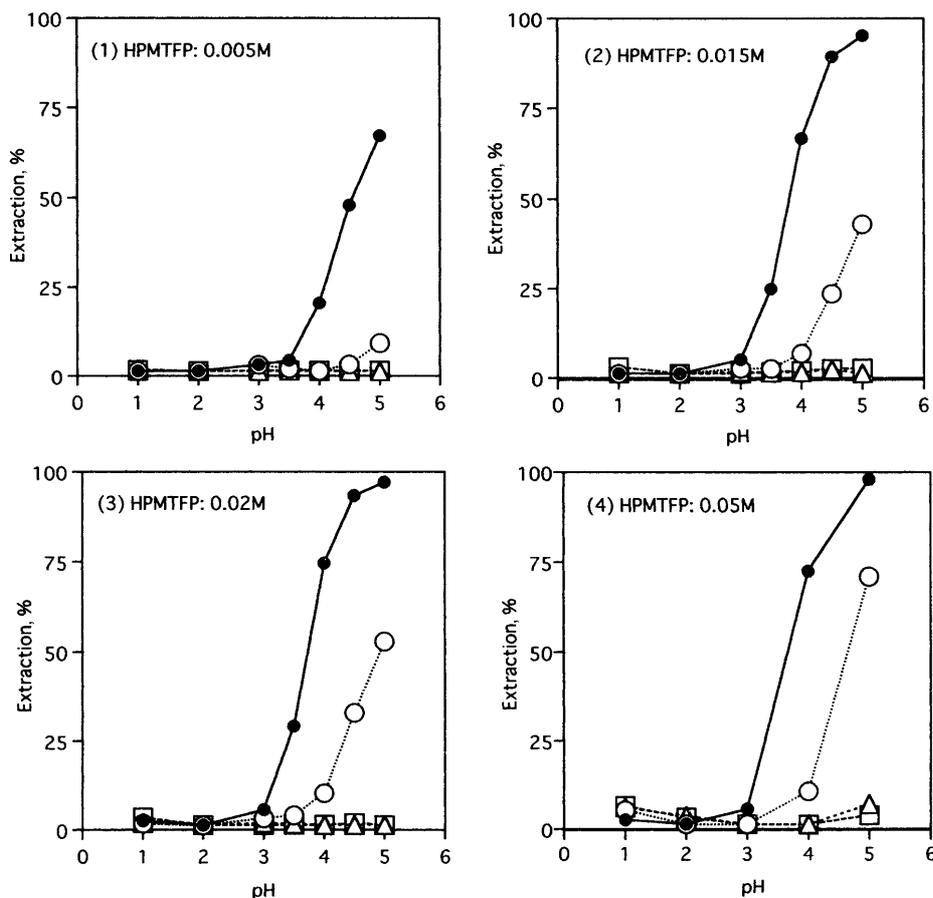


Fig. 4 Effect of HPMTFP concentration on the extraction of alkali earth metal elements into dibutyl ether

●: Mg; ○: Ca; △: Sr; □: Ba

ように、カルシウムが全く共存しない場合と同様であった。しかし、カルシウム濃度が 0.8 mg/ml を超えると、マグネシウムの抽出率は低下し、カルシウムが 3~10 mg/ml 共存すると抽出率は約 30~50% と大きく減少した。またマグネシウムの濃度が 0.01 や 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の場合にも検討したが同様の結果を示した。

以上の結果から、本溶媒抽出系により、貝殻や真珠の分解溶液中のマグネシウムを抽出分離後、測定、定量する場合、カルシウム濃度として 0.8 mg/ml (試料濃度として 2 mg/ml) 以下であればマグネシウムの抽出率に対する影響を考慮する必要はなかった。また貝試料の種類によって貝殻や真珠中のマグネシウム含量が極めて低く、試料濃度として 2 mg/ml を超えるような場合には溶媒抽出法に標準添加外挿法を併用するか、あるいは検量線用のマグネシウム溶液に分析試料と同じ濃度のカルシウムを添加して定量値を補正する方法が必要となる。しかし、3.3 で後述するように、本研究で分析に用いた実試料に対してはこのような方法による補正は必要としなかった。

### 3.3 貝の硬組織中マグネシウムの定量

**3.3.1 溶媒抽出によるマグネシウムの検量線と定量精度** 本前処理法である HPMTFP-ジブチルエーテル溶媒抽出系において、マグネシウムを抽出する際の pH 調整の厳密さなど実験や測定操作を含め、定量値の精度や正確さは非常に重要である。

まずマグネシウムの溶媒抽出法による検量線の直線性を調査した。操作は 2.3.2 に従い、pH 4.5 に調節したマグネシウム濃度 0.025, 0.05, 0.1, 0.3 及び 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の各水溶液 10 ml を、ブチルエーテル 10 ml で溶媒抽出し、有機相を ICP-AES に導入、発光強度を測定し、検量線を作成した。その結果、マグネシウム濃度と発光強度間の検量線は直線であり、その相関係数 ( $r$ ) は 0.98 であった。

また抽出後の有機相中のマグネシウムキレートを経過時間に対する安定性についても調べたが 5 時間経過しても発光強度に変化は見られなかった。

次に、定量精度を調べるため、天然貝殻試料中においてマグネシウムが低含量で知られる淡水産イケテヨウ貝の組成<sup>9)</sup>をもとに、0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のマグネシウム及び 700  $\mu\text{g}/\text{ml}$

のカルシウムや他のイオン類を混合した擬似試料溶液を100 ml 作製した。次に、これより10 ml を5個それぞれ分液漏斗に採取し、2・3・2の抽出操作後、ICP-AESにてマグネシウムを測定した。得られた5試料の平均値とその偏差は $0.0474 \pm 0.0027 \mu\text{g/ml}$ であり、その変動係数は5.7%であった。溶媒抽出操作を含んでいるにもかかわらず比較的よく一致した値が得られ、定量精度としては満足すべき結果であった。

以上の結果から、本溶媒抽出系がICP-AESによる貝殻や真珠中のマグネシウム定量の前分離処理法として十分適用できることを見いだしたので、次の3・3・2において実試料のマグネシウムの定量を試みた。

**3・3・2 実試料の分析結果** 淡水産及び海水産の貝の硬組織中のマグネシウムの定量を試みた。その結果、琵琶湖産イケチョウ貝の貝殻、真珠及び宍道湖産シジミ貝の貝殻において、それぞれ16.4、56.6及び293  $\mu\text{g/g}$ 、また伊勢湾産アコヤ貝の貝殻、真珠では2627と491  $\mu\text{g/g}$ であり、また瀬戸内海産ハマグリ貝殻とアサリの貝殻中には137と130  $\mu\text{g/g}$ の含有値が得られた。

本報は、貝の硬組織中微量マグネシウムをICP-AESにより測定・定量する際の前処理分離法として、溶媒抽出法を検討し、実試料分析への適用性について報告した。現在は高濃度カルシウムからのストロンチウムやバリウムの溶媒抽出分離について検討中であり、これらについては他の機会に報告する予定である。

## 文 献

- 1) K. M. Lee, J. Applenton, M. Cooke, K. Sawicka-Kapusta, M. Damek: *Fresenius J. Anal. Chem.*, **364**, 245 (1999).
- 2) 波部忠重, 奥谷喬司, 西脇三郎: “軟体動物学概説”, (1994), (サイエンティスト).
- 3) 北野 康: “炭酸塩堆積物の地球化学”, p. 15 (1990), (東海大学出版会).
- 4) 山形 登: “生物濃縮”, p. 253 (1987), (産業図書).
- 5) H. J. M. Bowen: “*Environmental Chemistry of the Elements*” (1987), (Academic Press, London).
- 6) O. Fujino, K. Orimi, T. Kotani, I. Nishino: *Jpn. J. Limnol.*, **60**, 607 (1999).
- 7) 福井博章, 藤野 治: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **51**, 891 (2002).
- 8) O. Fujino, S. Umetani, E. Ueno, K. Shigeta, T. Matsuda: *Anal. Chim. Acta*, **420**, 65 (2000).
- 9) O. Fujino, S. Umetani, M. Matsui: *Anal. Chim. Acta*, **296**, 63 (1994).
- 10) 原口紘彦: “生物無機化学の基礎”, (1992), (丸善).
- 11) 田中 久, 桜井 弘: “生物無機化学”, (1998), (博友社).
- 12) 松島美一, 高島良正: “生命の無機化学”, (1985), (廣川書店).
- 13) Z. B. Alfassi, C. M. Wai: “*Preconcentration techniques for trace elements*”, (1992), (CRC Press, London).
- 14) 日本分析化学会編: “分析化学便覧”, 改訂四版, p. 125 (1991), (丸善).
- 15) 赤岩英夫: “抽出分離分析法”, (1972), (講談社).
- 16) 田中元治, 赤岩英夫: “溶媒抽出化学”, (2000), (裳華房).
- 17) S. Umetani, M. Matsui: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **56**, 3426 (1983).
- 18) B. Jensen: *Acta Chem. Scand.*, **13**, 1668 (1959).
- 19) 原口紘彦, 久保田正明, 森田昌敏, 宮崎 章, 不破敬一郎, 古田直紀: “ICP 発光分析法”, p. 27 (1988), (共立出版株式会社).