溶媒抽出—原子スペクトル分析法による魚の鱗および骨中の多元素定量

北辻 真宏、吉田 卓司、藤野 治

Determination of Multi-Elements in Scale and Bone of Fish by Solvent Extraction–Analytical Atomic Spectrometry.

Masahiro KITATUJI, Takushi YOSHIDA, Osamu FUJINO

Research Institute for Science and Technology, Kinki University, Kowakae, Higashi-Osaka 577-8502, Japan

(Received, December 21, 2006)

Abstract

Determination of multi-elements in scale and bone of fish was examined using solvent extraction – analytical atomic spectrometry. Very large negative interference by the macro-component(calcium phosphate) appeared to exist simultaneously on graphite furnace - atomic absorption spectrometry(AAS) for Cu,Cd,Pb. Therefore, after scale and bone were treated with hot concentrated inorganic acids, these element in the sample solution were separated from macro component using solvent extraction. 10 µ l of the organic phase was injected directly in the graphite furnace atomizer of AAS. Other elements were determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES).

Keywords: ICP-AES, GF-AAS, Scale, Bone, Fish, Solvent extraction, DDTC, Hexyl acetate

1. 緒言

現在、微量元素の測定定量には原子スペ クトル分析法、すなわち誘導結合プラズマ 発光分析法(ICP-AES)やグラファイト炉 原子吸光分析法(GF-AAS)が、又近年では ICP-質量分析法が広く用いられるようにな った。これら分析法は多くの元素に対し非 常に感度が高いことで知られているが、し かし、天然試料中の極微量元素を測定する 際、共存マクロ成分からの干渉を受ける場 合が多く、測定前に目的元素と干渉元素と の分離処理(以後は前処理法と略記)を必 要とする場合が多い。 天然に存在するリン酸カルシウムはアパ タイト[Ca₁₀(PO₄)₆X₂]と呼称され、X がFで 置換されたフルオロアパタイト[Ca₁₀(PO₄)₆ F₂]は鉱物に多く見られ、さらに哺乳類、 魚類、鳥類など脊椎動物の硬組織である骨, 歯および鱗などの無機主成分は X が水酸基 であるヒドロキシアパタイト(以後 HAp と 略記)[Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂]として知られている。 またこれら HAp は有機物成分としてコラ ーゲン等を有しており、その結晶構造は、 六方晶形である。

魚の鱗は楯鱗 (Placoid Scale)、コズミン

鱗(Cosmoid Scale)、硬鱗(Ganoid Scale)、
 円鱗(Cycloid Scale)、櫛鱗(Ctenoid Scale)の5種類に分類されており、その中でも円
 鱗は表面が骨質層で、底層はコラーゲン繊維で形成されている。また鱗は表面に刻まれている鱗紋を解読することにより年齢査定、系群分析を行うことができる。¹⁾

著者らは魚の鱗に棲息環境水中の微量元 素が取り込まれることにより、環境汚染の 指標生物となり得るのではないかと考え、

2. 試薬、装置および実験操作

2-1. 試薬

標準溶液:使用した標準溶液はナカライ テスク株式会社製および関東化学株式会社 製の原子吸光分析用標準溶液(1mg/ml)を使 用した。

試薬類:使用した試薬類はナカライテス ク株式会社製および関東化学株式会社製の 特級を使用した。

2-2. 装置

発光強度測定は、日本ジャーレルアッシ ユ株式会社製高周波発光分析装置 ICP575 (発振周波数: 27.12MHz、定格出 力:2kW、回折格子:1800本/mm、スリッ ト幅:10um)を使用した。また、ネブライ ザーは同社のクロスフローを用いた。吸光 度測定は、日本ジャーレルアッシュ株式会 社製 SOLAAR969 シリーズ(UNICAN GF90 plus furnace, UNICAN 969Z AA spectrometer, Fs90 plus furnace autosampler)を使用した。 また、ランプは同社のホローカソードラン プ(中空陰極ランプ)を、キュベット(グ ラファイトチューブ)は Thermo Elemental 社の SOLAAR Graphite Cuvettes Type Normal Cuvettes を使用した。X 線回折パタ ーン測定には、理学電気株式会社製の粉末 X 線回折装置(RINT2500)を用い、以下の条 件で測定を行った。X 線:Cu K-ALPHA1 /40kV /80mA、ゴニオメーター:RINT2000 広 角ゴニオメーター、発散スリット、散乱ス

3.結果と考察

3-1. 共存するマクロ成分アパタイ

まず ICP-AES および GF-AAS 法によりこれ ら試料中の 12 元素の定量法の確立, 特に 本報では微量重金属イオン類に対する干渉 マクロ成分リン酸カルシウムからの分離前 処理法としての溶媒抽出法について詳細な 検討を行った後、さらに環境化学的見地よ リブラックバス中の 12 元素の鱗や骨中含 量の比較および生息環境水中イオン類との 濃度比についても検討を加え、注目される 現象を見出したので、ここに報告する。

リット:1deg、受光スリット:0.15mm、走査 モード:連続、スキャンスピード:6°/min、ス キャンステップ:0.02°、走査軸:20/θ、走査範 囲:20~60°、θ オフセット:0°、固定角:0°。 pH メーターには、株式会社堀場製作所製ガ ラス電極式水素イオン濃度計(型名:カス タニーLAB 型 F-22)を使用した。振とう機 には、イワキ産業株式会社 KM 式万能シェ ーカー(型式: V-SX)を使用した。遠心分 離機には、株式会社久保田製作所卓上用小 型遠心分離器(型式: KC-25)を使用した。

2-3. 実験操作

2-3-1. 実試料の分解

採取した鱗、骨を純水で洗浄し風乾させた後、1g秤量し、硝酸、王水、過塩素酸を順次加え加熱、この操作を繰り返し、試料を完全に分解した後、乾固し、白色沈殿を塩酸と純水で50ml(20mg/ml)とした。

2-3-2. 抽出操作

分液ロートに 2-3-1 で得られた試料溶液 2mlをとり、マスキング剤として 0.1M クエ ン酸 0.5mlを加え、緩衝液として 1M 酢酸 1mlを加え、これを pH6 に調整し全容量を 10ml にした後、キレート試薬として 10%DDTC 溶液を 0.1ml 加え、次いでこれ に有機溶媒として酢酸ヘキシルを 2ml 加え た。振とう機で 10 分間振とうさせた後、有 機相と水相を遠心分離し、有機相中 Cu,Pb および Cd を GF-AAS 法により測定した。

トの影響

3-1-1. ICP-AES における HAp の影響

まず、目的元素 K, Na, Mg, Sr, Mn, Zn およ び Fe の測定に対し実試料中の無機主成分 である HAp が共存した場合の濃度の影響 について ICP-AES により検討し、その結果 を Fig.1.に示した。多くの元素に対し HAp は干渉を示さなかったが、K と Na につい ては HAp が 100ppm まで干渉は無いが、 1000ppm になると正の干渉を示している。 この理由として、Saha の気体中におけるイ オンの電離論に基づけば、多量の Ca がプラ ズマ内においてイオン化され、それに伴っ て放出された電子が多量の K や Na イオン を還元し、これらの中性原子の数を増加さ せたことによるのではないかと考えられる。

3-1-2. GF-AAS における微量重金属元素 に対する HAp の影響

微量成分 Cd, Cu, Pb については GF-AAS において検討を行った。得られた結果を Fig.2.に示した。Cu については 100ppm まで はほとんど干渉は見られなかったが、1000 から 10000pm と濃度上昇に従って大きな 負の干渉を受けた。Cd, Pb については 100ppm までは正の干渉を受け、1000ppm 以 上になると Cu と同じくこれらは大きな負 の干渉を示した。

以上の結果によれば実試料中微量元素を GF-AAS において定量する際には、共存す るマクロ成分アパタイトを分離した後、測 定する必要があった。そこで本研究では前 処理分離法として溶媒抽出法を用いること にした。

3-2. 溶媒抽出法

まず、前処理分離法として溶媒抽出法を 行うにあたりキレート試薬の選定には重金 属イオンと安定なキレートを形成し、アル カリ金属、アルカリ土類金属とはキレート を形成しないジエチルジチオカルバミン酸 ナトリウム(以後、DDTC と略記)を用い ることにした。この DDTC は S,S の 2 座配 位子により遷移金属イオンと安定なキレー トを形成することで知られている。

次に有機溶媒の選定については粘性があ まり高くなく、ICP-AES のプラズマが安定 で、トーチに炭素が付着せず、また GF-AAS においても使用する事ができ、さらに環境 水中のイオン類の濃縮手段として水に溶け にくい有機溶媒が必要であった。これらに ついては著者らが以前報告した実験結果に 基づき、ここでは酢酸ヘキシルを用いるこ とにした。²⁾³⁾⁴⁾



Fig 1. Effect of synthetic hydroxyapatite concentrations on the emission intensity of Na, K, Mg, Sr, Mn, Fe, Zn by ICP-AES

 $\begin{array}{ll} Na:10ppm (4.35x10^4mol/l), & K:10ppm (2.56x10^4mol/l), & Mg:1ppm (4.11x10^5mol/l) \\ Sr:0.1ppm (1.14x10^6mol/l), & Mn:0.1ppm (1.82x10^6mol/l), & Fe:1ppm (1.79x10^5mol/l) \\ Zn:1ppm (1.53x10^5mol/l) \end{array}$



Fig 2. Effect of synthetic hydroxyapatite concentrations on the absorbance of Cd, Cu, Pb by GF-AAS

 $Cd:1ppb\,(\,8.90x\,10^9mol/l\,\,),\qquad Cu:5ppb\,(\,7.85x\,10^8mol/l\,\,),\qquad Pb:10ppb\,(\,4.83x\,10^8mol/l\,\,),$

3-2-1. 抽出時の pH の影響

酢酸ヘキシル-DDTC 系を使用するにあ たり、各金属元素の抽出時における水相の pHとCu,PbおよびCdの抽出率との関係に ついて、pH2-8の範囲で検討し、その結果 を Fig.3.に示した。各元素はいずれも pH6 未満では抽出率が低くなり pH が 6 以上で は定量的に抽出された。前者については水 素イオン濃度が高く、金属イオンと DDTC とのキレート形成が阻害され、pH6 以上で は、いずれの元素もほぼ安定なキレートを 形成するためと考えられる。また、Ca,Pと もにいずれの pH においても抽出されない ことが明らかとなった。以上の結果より、 各金属元素の共存多量成分 Ca と P からの 分離という点では十分なデータであり、本 研究では以後の抽出時の pH に 6 を用いる 事とした。



hexyl acetate

 Cd:lppm(8.90x10⁴mol/l),
 Cu:l0ppm(1.57x10⁴mol/l),
 Pb:l0ppm(4.83x10⁵mol/l)

 Mn:l0ppm(1.82x10⁴mol/l),
 Fe:l0ppm(1.79x10⁴mol/l),
 Zn:l0ppm(1.53x10⁴mol/l)

 Ca:l0ppm(2.50x10⁴mol/l),
 Fe:l0ppm(1.79x10⁴mol/l),
 Zn:l0ppm(1.53x10⁴mol/l)

formic acid : 0.1mol/l (pH2,3), acetic acid : 0.1mol/l (pH4, 5, 6, 7), citric acid : $5x10^{-3}mol/l$ DDTC : 4.44x10⁻³mol/l, shaking time : 10min, volume specific : Vo/Va = 1

3-2-2. DDTC 濃度の影響

各元素の抽出時に使用する DDTC 濃度の 影響について検討した結果を Fig.4.に示し た。 DDTC 濃度は 4.44×10⁻⁵mol/l -1.38×10⁻¹mol/l の範囲内で検討を行ったが、 各元素が定量的に抽出される DDTC 濃度は Cu が 4.44×10⁻⁴mol/l、Pb, Cd, Zn, Fe は 2.22×10⁻³mol/l、Mn については4.44×10⁻³mol/l であった。そのため、各元素を同時に定量 的に抽出する為には DDTC 濃度が 4.44×10⁻³mol/l (0.1%) は必要であった。

3-2-3. 抽出時のボリューム比

微量元素については HAp からの分離だ けではなく、GF-AAS において測定可能な 濃度が必要であった。その為、感度不足の 元素においては天然試料からの濃縮が不可 欠であり、本系を用いた場合の有機相(Vo) および水相(Va)のボリューム比が1-100 倍であるときの抽出率に対する影響を検討 し、その結果を Fig.5.に示した。ここに見ら れるように各元素ともに Va/Vo=50 までは ほぼ定量的に抽出される事を示した。しか し、100倍になると抽出率が低下したため、 検量線法で定量する場合には、検量線も同 じ Va/Vo の条件下で抽出したものを使用す る必要があった。



Fig.4. Effect of DDTC concentrations for Mn, Fe, Zn, Cu, Cd and Pb at pH6

$$\begin{split} &Mn:10ppm (1.82x10^4mol/1), \quad Fe:10ppm (1.79x10^4mol/1), \quad Zn:10ppm (1.53x10^4mol/1), \\ &Cu:10ppm (1.57x10^4mol/1), \quad Cd:1ppm (8.90x10^4mol/1), \quad Pb:10ppm (4.83x10^4mol/1) \\ &acetic acid: 0.1mol/1, citric acid: 5x10^{-3}mol/1, shaking time: 10min \\ &volume specific: Vo/Va = 1, organic solvent: hexyl acetate \end{split}$$



Fig .5. Effect of Va/Vo ratio on the extraction of Cd ,Pb ,Cu by ICP-AES

Cd: 1ppm (8.90x10⁶mol/l), Pb:10ppm (4.83x10⁵mol/l) Cu:10ppm(1.57x10⁴mol/l) acetic acid : 0.1mol/l, citric acid : 5.0x10³mol/l, DDCT : 4.44x10³mol/l shaking number of times : 500 times, organic solvent : hexyl acetate

3-2-4. 抽出率に対するヒドロキシアパタ イト濃度の影響

実試料中の微量元素を溶媒抽出法により 分離する際の HAp 濃度の Cu,Pb および Cd の抽出率に対する影響について検討し、そ の結果を Fig.6.に示した。HAp の濃度は 10¹-10⁶ppb の範囲内で検討したが、各元素いず れも定量的に抽出され、共存するマクロ成 分 HAp からの抽出挙動に全く影響しない 事が明らかとなった。 以上の結果より3元素に対する本溶媒抽 出系がGF-AAS法における前処理法として 十分至適であることが示された。



Fig.6. Effect of HAp concentrations on the extraction of Cd, Cu, Pb

Cd : 1ppb (8.90x10⁻⁹mol/l), Cu : 10ppb (7.85x10⁻⁸mol/l), Pb : 10ppb (4.83x10⁻⁸mol/l) acetic acid : 0.1mol/l, citric acid : 5.0x10⁻³mol/l, DDTC : 4.44x10³mol/l shaking time : 10min, organic solvent : hexvl acetate

3-3. 実試料淡水産ブラックバス中 多元素定量

実試料ブラックバス中の Ca, P, K, Na, Mg, Sr, Mn, Zn, Feの9元素に対しては ICP-AES を用いて測定・定量を行った。 K, Na 以外 の7元素についてはそのまま検量線法によ り定量し、KとNaについてはCaの影響を 受けるため、標準添加外挿法を用いて測定 した。 微量重金属元素である Cd, Cu, Pb に ついては 3-2 で上述したように本溶媒抽出 系を用いて HAp を分離し、また天然水にお いては濃縮した後、GF-AAS により測定・ 定量した。得られた結果を Table.1.に示した。 骨、鱗共に Ca, P は非常に高含量であり、 これらの Ca/P のモル比は骨、鱗においてそ れぞれ 1.58 と 1.57 であり、標準 HAp の 1.67 に対し、若干 Ca 不足ではあるがほぼ近い値 を示した。さらに結晶構造については Fig.7. のX線回折パターンに見られるように、面 間隔から HAp であることが同定できたが、 ピークがブロードでありアモルファス状態 の結晶であることを示唆した。

高含量順としては鱗、骨ともにアルカリ 金属、アルカリ土類金属元素、Zn,Fe,Mn の順となり、Cu、Pb はさらに低い値を示し た。Cd については極低濃度であるためか検 出する事ができなかった。骨に比較し鱗で は、相対的にK がかなり低値を、他元素は ほぼ類似した値を示した。また、得られた 値と生息環境水との濃度比、即ち骨や鱗の 硬組織における元素含量と生息環境水との 濃度比においては、Pが非常に高い値を示 している。これは生息環境水からの影響だ けではなく、捕食している餌からの蓄積に よるのではないかと考えられる。なお、Sr や Mg が相対的に骨や鱗において高い値を 示しているが、結晶学的には Ca と同形置換 を生じやすいものと考えられる。また低含 量 Zn が高い濃度比を示しているが、これは 生息環境水との関連性から極めて興味深い 結果であるが、これらについては現在詳細 な研究を行っており、他の機会に報告する 予定である。

Table.1. Determination and concentartion ratio of multi-elemei in bone and scale of Largemouth Bass

	Content value (ppm)		Pond water	Concentration ratio	
	Bone	Scale		Bone	Scale
Ca	77110	87740	15	5141	5849
Р	37630	42430	0.03-0.003 ⁵⁾	$1.25x(10^6-10^7)$	$1.41x(10^{6}-10^{7})$
Κ	1413	368.5	1.6	883	230
Na	1547	1483	9.4	165	158
Mg	1408	2017	1.7	828	1186
Sr	137	178.5	0.076	1798	2343
Mn	5.85	8.59	0.0666	88	129
Zn	39.1	46.8	0.0288	1360	1626
Fe	14.9	37.7	0.222	67	170
Cu	1.13	1.83	0.022	51	82
Pb	0.36	0.41	0.0023	157	178
Cd	< 0.005	< 0.005	0.0002	<2.5	<2.5



Fig .7.The x-ray diffraction pattern of scale of fish and standard HAp

参考文献

- 1) 岩井保, 魚学入門, (2005), (恒星社厚生 閣)
- 2) O.Fujino, H.Fukui, 近大理工総研報, 14, 5, (2001)
- 3) O.Fujino, H,Fukui, M.Kitatuji, 近大理工 総研報, 17, (2005)
- 4) H.Fukui, O.Fujino, 分析化学, 51, 891(2002)
- 5) 森永太一郎, 堀智孝, 琵琶湖の環境化学, (1982), (日本学術振興会)
- 6) J.D.Kinrade, J.C.VanLoon, Anal. Chem., **46**, 1894(1974)
- 7) O.Fujino, et.al, Jpn .j. Limnol., **60**, 610(1999)
- 8) R.J.Everson, H.E, Parker, Anal. Chem., 46, 1966(1974)
- 9) J.C. Chambers, B.E.Mcclellan, Anal. Chem., **48**, 2061(1976)
- 10) J.P Riley, D. Taylor, Anal. Chim. Acta, **40**, 479(1968)
- 11) D.C. Burrell, Anal. Chim.Acta, **38**, 447(1967)
- 12) Y.K.Chau, P.Y. Wan, Talanta, 15, 867(1968)