length spectrophotometric method with masking the color due to the substrate, phenolphthalein monophosphate. The standard procedure for the assay of both activities is as follows: Five ml of 80% sulfuric acid-ethanol solution is added to the mixture resulted from the enzymatic reaction of ALP (in ACP activity, the reagent solution is added to the mixture until the volume is 5 ml). After mixing, the absorbance is measured at λ_1 413 nm, λ_2 506 nm for ALP activity and at λ_1 427 nm, λ_2 501 nm for ACP activity, respectively. The correlation coefficient between this method and Babson's method (Huggins-Talalay's method) for the control serum was 0.992 ($n=39$)

[0.984 ($n=31$)].

(Received Jan. 18, 1978)

Keywords

Acid phosphatase

Alkaline phosphatase

Phenolphthalein

Spectrophotometry

Sulfuric acid

Two-wavelength spectrophotometry

黒鉛炉・フレイムレス-2 チャンネル原子吸光法による 水中の微量のカドミウムと銅の同時定量

田中 俊行, 林 康久, 石沢 正一*

(1978 年 3 月 13 日受理)

ppb レベルのカドミウムと銅を正確にかつ迅速に定量するために黒鉛炉・フレイムス-2 チャンネル原子吸光法による同時定量法を検討した。その結果、同時定量の原子吸光測定条件は次のとおりである。乾燥 20A-30s (約 180°C), 灰化 35A-60s (約 470°C), 原子化 240A-10s (約 2700°C), アルゴン流量 3 l/min.

試料液を 20 μ l 採取する際、検量線はそれぞれカドミウムについて 2.5 ppb 以下、銅については 250 ppb 以下で直線性を示した。原子吸光に及ぼす各種酸の影響を検討した結果、同時定量を (0.1~0.5) N 硝酸酸性で行うことが最良であった。又、試料液を硝酸酸性とすることは、アルカリ塩類の分子吸光の抑制に有効であった。カドミウムの定量において、吸光値としてピークの高さの代わりにピーク面積をとることによって共存イオンの干渉を大幅に抑制することができた。なお、本法を河川水、排水に適用し、バックグラウンド補正法との比較を行い、満足すべき結果を得た。

1 緒 言

黒鉛炉・フレイムレス原子吸光法は高感度であり、かつ又微量試料に対しても適用できる利点を持つことから、微量金属の分析法として公害関係、医学などの分野で急速に普及してきている。しかしながら、黒鉛炉・フレイムレス原子吸光法は、目的元素の原子化の前段階として、試料中の水分及び酸の除去(乾燥過程)、更に共存する有機物の灰化及び塩類の除去(灰化過程)を行う必要があり、環境試料、生体試料などのサンプル数が多

い場合には化学フレイム法に比べて迅速性の点で劣るように思われる。本研究では定量の迅速性を上げる意味でフレイムレス-2 チャンネル原子吸光法を用い、環境汚染物質として知られているカドミウムと銅について同時定量する場合の基礎的諸条件、すなわち原子化条件、共存酸及び塩類の干渉とその抑制法などを検討した。

なお、2 チャンネル原子吸光法で2 元素同時定量を行うには、分子吸光などの分光学的干渉を除く必要があり、塩化ナトリウムの分子吸光を硝酸の共存によって抑制している Frech らの報告¹⁾に着目して、著者らも硝酸アンモニウム²⁾、並びに硝酸の添加によってアルカリ塩類の分子吸光を抑制する効果を比較検討した。又、本

* 鳥取大学医学部公衆衛生学教室: 鳥取県米子市西町 86

法を河川水や排水などに適用し、バックグラウンド補正法との比較を行い、満足すべき結果を得た。

2 実 験

2.1 試 薬

カドミウム標準溶液：金属カドミウム (99.999%) 0.500 g を少量の硝酸 (1+1) に溶かし、水浴上で蒸発乾固した後、少量の硝酸及び水を加えて溶かし、水で正確に 500 ml とした (Cd: 1000 ppm)。なお、酸濃度は約 0.1 N 硝酸酸性となるように調整した。

銅標準溶液：金属銅 (99.999%) 0.500 g をひょう取し、上記と同様の操作を行った (Cu: 1000 ppm, 約 0.1 N 硝酸酸性)。

実験に際しては、上記の金属イオン標準溶液を 0.1 N 硝酸で適宜希釈して用いた。なお、水はイオン交換を行った後、蒸留したものを用いた。

2.2 装 置

原子吸光分析装置は、日本ジャーレル・アッシュ社製 AA-8500 型 (2 チャンネル) 原子吸光分析装置に同社製フレームレスアトマイザー FLA-100 型を取り付けて用いた。光源はカドミウム、銅ともに浜松テレビ社製 L-233 型中空陰極ランプ、バックグラウンド補正用としては同社製熱陰極タイプ重水素ランプを使用した。記録計は理化電機工業社製 B-28H 型を使用した。黒鉛炉への試料液の注入にはギルソン社製ビベットマン P-200 型を用いた。

2.3 測定操作

試験溶液 20 μ l (カドミウムとして 0.05 ng 以下、銅として 5 ng 以下を含む) を黒鉛炉に注入し、アルゴンガスを通じながら、乾燥、灰化、原子化を行い、カドミウムと銅の原子吸光を同時に測定する。原子吸光の測定条件は Table 1 に示すとおりである。

Table 1 Instrumental operating conditions

Operation step	Current (A)	Time (s)	Mode	Final temp. (°C)
Drying	20	30	Ramp	ca. 180
Ashing	35	60	Ramp	ca. 470
Atomization	240	10	Ramp	ca. 2700

Analytical wavelength: Channel A 228.8 nm (Cd), 10 mA, Channel B 324.7 nm (Cu), 10 mA; Argon gas flow rate: 3 l/min; Damp.: 1; Sens.: 0; Sample volume: 20 μ l

3 結果と考察

3.1 測定条件の検討

3.1.1 灰化条件 2.3 の測定操作において、試料を灰化する際の電流を種々変化させてカドミウムと銅の吸光値に及ぼす影響を検討した。その結果、Fig. 1 に示す

Fig. 1 Effect of atomization conditions on the signals for cadmium and copper

A: Cd 2.0 ppb; B: Cu 200 ppb; Sample volume: 20 μ l; Acidity: 0.1 N in HNO_3

ように、カドミウムについては (30~40) A の範囲で、銅については (30~80) A の範囲で最大かつほぼ一定の吸光値が得られた。以上のことから、同時定量の灰化条件は、カドミウムの条件に併せて灰化電流を 35 A、灰化時間を 60 秒に設定した。

3.1.2 原子化条件 2.3 の測定操作においてカドミウムと銅を原子化させる際の電流を種々変化させて吸光値に及ぼす影響を検討した。その結果も Fig. 1 に示す。カドミウムについては 160 A 以上で最大かつ一定の吸光値が得られたが、銅については 180 A-10 s 以下ではメモリー効果が表れた。従って、同時定量の原子化条件は銅の条件に合わせ、240 A-10 s に設定した。

3.2 検量線

検量線は 2.3 の測定操作に従ってカドミウム、銅の共存溶液を用いて作成した。カドミウムと銅が共存することによる相互干渉をみるために、その存在比を変化させてそれぞれの吸光値に及ぼす影響を検討した。カドミウムに対する銅の存在比 (ppb 濃度比で表す) を 100 とした基準検量線と、その存在比を (20~500) 倍変動させた検量線を比較したところ、カドミウム、銅の各々について同一濃度での吸光値に有意な差はみられなかった。よって、定量にはカドミウムに対する銅の存在比を

100 とした共存溶液を用いて検量線を作成した。なお、試料液を 20 μ l 採取した際、検量線はカドミウムについては 2.5 ppb 以下、銅については 250 ppb 以下で直線性を示した。又、本法の感度は 1% 吸収でカドミウム、銅についてそれぞれ 0.030 ppb, 1.9 ppb であった。更に、10 回の繰り返し実験によって精度を求めたところ、カドミウム 2.0 ppb, 銅 200 ppb の濃度レベルで標準偏差パーセントはそれぞれ 2.4%, 1.4% であった。

3.3 共存物質の影響

3.3.1 酸濃度の影響 試料の前処理によく用いられる塩酸、硝酸、硫酸について酸濃度を種々変化させて、カドミウムと銅の吸光値に及ぼす影響を基準の 0.1N 硝酸酸性溶液と比較することによって検討した。その結果を Fig. 2 に示す。硝酸は 0.5N 以下の濃度でカドミウム及び銅の吸光値に全く影響しないが、硫酸、塩酸はその濃度領域で吸光値を減少させた。酸素酸である硝酸と硫酸溶液でのこの差異は、硫酸が高温で分解蒸発するための飛散による損失が反映しているものと思われる³⁾。なお、カドミウムについて 0.5N 以上の硫酸溶液で吸光値が増大しているのは、黒鉛炉内に残存している硫酸の分解生成物の分子吸光とカドミウムの原子吸光が同時に重なって観測される³⁾ためであり、重水素ランプによる補正を行うことにより吸光値は減少した。銅について吸光値の増大がみられないのは、324.7nm での分子吸光値が 228.8nm での値に比べて小さいことと銅が高温で原子化することによって分子吸光の重なりがほとんどないためである。硝酸と塩酸溶液での差異は原子化過程の

Fig. 2 Effect of acids on the signals for cadmium and copper

A: Cd 2.0 ppb; B: Cu 200 ppb; --- Standard levels; Sample volume: 20 μ l; $\circ$, $\triangle$ HNO₃; $\bullet$, $\blacktriangle$ HCl; $\bullet$, $\blacktriangle$ H₂SO₄; — Without background correction; - - - With background correction

違いによると考えられる。つまり、カドミウム、銅は硝酸溶液では乾燥、灰化過程で酸化物となり、それが熱解離及び黒鉛炉表面での還元によって原子化される^{4)~6)}と考えられる。一方、塩酸溶液では乾燥、灰化過程で塩化物となり、それは酸化物より揮発性が大きい⁷⁾ために、灰化・原子化過程で塩化物としての揮発による損失が吸光値の減少を引き起こすものと考えられる。

そこで、塩酸溶液での負の干渉は硝酸を共存させることにより抑制できるのではないかと考え、単独で吸光値に影響しない濃度領域{0.1~0.5 N}の硝酸を塩酸溶液に共存させて、その影響を検討した。その結果を Fig. 3 に示す。硝酸の共存によってカドミウム、銅の吸光値は増大した。特に、カドミウムについてその効果が大きく、0.5N 塩酸溶液において 0.2N 以上の硝酸を共存させることにより、吸光値が基準の 90% 以上にまで回復した。

Fig. 3 Effect of nitric acid to avoid the interference of hydrochloric acid

A: Cd 2.0 ppb; B: Cu 200 ppb; --- Standard levels; Sample volume: 20 μ l; $\circ$, $\triangle$ 0.5N in HCl; $\bullet$, $\blacktriangle$ 1N in HCl

なお、Fig. 2 の硝酸 1N 以上での吸光値の急激な減少は、硝酸の強力な酸化による黒鉛炉の劣化のためと考えられる。

3.3.2 アルカリ塩類の分子吸光に及ぼす硝酸の効果

最近、高濃度の塩化ナトリウム溶液中の鉛を定量する際に、塩化ナトリウムによる分子吸光を硝酸を共存させて抑制する方法が報告されている¹⁾。カドミウムの共鳴吸収波長 228.8nm で重水素ランプを使用して、著者らも塩化ナトリウムの分子吸光に対する硝酸の抑制効果を検討した。又、同時に硝酸アンモニウム²⁾の抑制効果との比較も行った。それらの結果を Fig. 4 に示す。塩化ナト

Fig. 4 Effect of nitric acid on non-specific absorption caused by sodium chloride at 228.8nm

○ Water; ● 0.1 M in HCl; △ 0.1 M in HNO₃;
□ 0.1 M in NH₄NO₃

リウムの水溶液及び塩酸溶液では、注入量 20 μ l, ナトリウム濃度 200 ppm において分子吸光が吸光度で約 0.8 と観測された。ところが、0.1 N 硝酸溶液で分子吸光は全く観測されなかった。これは、塩素イオンに比べて過剰の硝酸イオンが存在するために乾燥、灰化過程で硝酸ナトリウムや酸化ナトリウムなどが生成して、塩化ナトリウムが生成されないことによるものと考えられる。又、塩化ナトリウムの分子吸光に対する硝酸と硝酸アンモニウムの抑制効果を同モル濃度で比較したところ、硝酸のほうが分子吸光値をより大きく減少させた。又、塩化カリウムの分子吸光の抑制にも硝酸を共存させることが有効であることが分かった。

3.3.3 金属イオンの影響 まず、通常の用水に多量に含まれていると考えられるアルカリ金属、アルカリ土類金属イオンの濃度を種々変化させて 0.1 N 硝酸溶液でのカドミウム、銅の吸光値に対する影響を検討した。その結果を Fig. 5 に示す。カドミウム、銅の吸光値はいずれも共存イオン濃度の増大とともに減少してゆく。又、共存イオン濃度が同じ場合には、銅よりカドミウムに対して大きな負の干渉を示した。この理由の一つとして、黒鉛炉からアルカリ、アルカリ土類金属塩がかなり除去された後、銅が高温で原子化するのに対して、カドミウムは比較的低温で原子化するために、それらの影響が大きいものと考えられる。なお、カドミウムに対するナトリウム及びカリウムイオンの負の干渉は灰化電流を下げることによって大幅に改善された。

次に、この同時定量において、一般の用水及び排水に存在している他の主な金属イオンの許容量を Table 2

Fig. 5 Interference of alkali and alkaline earth metals on the determination of cadmium and copper

Cd : 2.0 ppb, Cu : 200 ppb; Sample volume : 20 μ l;
Acidity : 0.1 N in HNO₃; ○ Na; ● K; △ Mg;
▲ Ca; Four elements above were added as chlorides.

Table 2 Permissible amounts of diverse metal ions on the determination of cadmium and copper (within 10% errors)

Ion	Added as	Permissible concn. (ppm)	
		for Cd	for Cu
Al(III)	AlCl ₃	400	400
Cr(III)	CrCl ₃	> 1000	> 1000
Mn(II)	MnCl ₂	80	200
Fe(III)	FeCl ₃	200	200
Co(II)	CoCl ₂	80	400
Ni(II)	NiSO ₄	6	> 1000
Zn(II)	Zn(NO ₃) ₂	3	> 1000
Pb(II)	Pb(NO ₃) ₂	2	> 1000

Cd : 2.0 ppb, Cu : 200 ppb; Sample volume : 20 μ l; Acidity : 0.1 N in HNO₃; Measure of absorbance : Peak-height

に示した。Table 2 から分かるように、カドミウムの定量において比較的低温で原子化する亜鉛、鉛の許容量が小さいことは興味深い。又、カドミウムの吸光値を大きく減少させるカリウムと鉛を選び、吸光値の表示法として peak-height 法と peak-area 法とを比較検討した。その結果、peak-area 法を用いることによって peak-height 法での負の干渉を大幅に改善することができた。

4 実試料への応用

本法を実試料の分析に適用する試みとして河川水、排

水中のカドミウム, 銅の定量に応用し, 同時にバックグラウンド補正法による定量値との比較を行った. 又, 定量に際して検量線法と標準添加法を行って, 両法の値を比較した.

4.1 試料の採取・調製及び定量操作

試料の採取法は公害分析指針⁹⁾に準じた. 次いで, 採水時に試料 1 l 当たり濃硝酸 10 ml を加えたものをポリエチレン容器に保存し, それを検水とした. なお, カドミウム 2.5 ppb 以上, あるいは銅 250 ppb 以上の濃度のものは, 0.1 N 硝酸で適宜希釈して検水とした. 定量には検水の 20 μ l を採り, 2.3 の測定操作に従って操作した.

4.2 分析結果

本法により某銅鉱山水系の河川水, 池の水 (pH=3), 及び医学部排水中のカドミウム及び銅の同時定量を行った. その結果を Table 3 に示す.

Table 3 Analytical results of cadmium and copper in various waters

Sample		Simultaneous method		Background correction method†	
		Cd(ppb)	Cu(ppb)	Cd(ppb)	Cu(ppb)
River water	1 {a	3.8	1.3×10^3	3.8	1.3×10^3
	b	3.9	1.3×10^3		
"	2 {a	12	3.2×10^3	12	3.2×10^3
	b	13	3.4×10^3		
"	3 {a	0.53	83	0.52	83
	b	0.40	79		
Pond water	1 {a	2.6	190	2.6	190
	b	2.7	190		
Waste water	1 {a	ND	8	ND	8
	b	ND	8		
"	2 {a	0.43	13	0.45	13
	b	0.38	13		

† With background correction at 229 nm (D_2) for cadmium and at 323 nm (Ne) for copper; a : Standard addition method; b : Calibration curve method; ND : Not detected

本法による結果は, バックグラウンド補正によってカドミウム, 銅をそれぞれ定量した値とよく一致した. よって, 本法は河川水, 排水に十分適用できると考えられ, カドミウム, 銅の迅速定量が期待できる. 又, 検量線法と標準添加法による値を比較したところ, ほとんどの試水について両者はよく一致した. ところが, 河川水 3 においてカドミウムの値が両法で大きく食い違った. これは, 試料を河口付近で採取しており, 多量のナトリウムイオンの共存による負の干渉が現れているものと考えられる.

5 結 言

黒鉛炉・フレームレス-2 チャンネル原子吸光法による水中の微量カドミウム及び銅の同時定量法を研究した.

試水の前処理としての酸による調整は, カドミウム, 銅の原子化に及ぼす各種酸の影響を検討した結果と塩化ナトリウムなどの分子吸光に対する抑制効果を検討した結果から, (0.1~0.5) N 硝酸酸性とすることが最も望ましいと考えられる. 本法を実試料に適用する際, 共存物質を多量に含む試水に対しては標準添加法を行う必要があるが, 通常の河川水については検量線法で十分定量可能である. なお, 塩化ナトリウムを大量に含むような試水についてはバックグラウンド補正, あるいは溶媒抽出^{9)~11)}やイオン交換によるマトリックスからの分離が必要である. 本法は検水を直接に黒鉛炉に注入する簡易な操作と 2 元素を同時に定量することによる迅速性の点から, 水中の微量カドミウム, 銅の定量法として有力である.

本研究の経費の一部は厚生省医療研究助成補助金によった.

(1977 年 10 月 13 日, 日本分析化学会第 26 年会において一部発表)

文 献

- 1) W. Frech, A. Cedergrén : *Anal. Chim. Acta*, **88**, 57 (1977).
- 2) R. D. Ediger, G. E. Peterson, J. D. Kerber : *At. Abs. Newslett.*, **13**, 3 (1974).
- 3) 田中俊行, 山本勇麓 : 日本分析化学会第 25 年会講演要旨集, p. 250 (1976).
- 4) J. Aggett, A. J. Sprott : *Anal. Chim. Acta*, **72**, 49 (1974).
- 5) W. C. Campbell, J. M. Ottaway : *Talanta*, **21**, 837 (1974).
- 6) R. E. Sturgeon, C. L. Chakrabarti, C. H. Langford : *Anal. Chem.*, **48**, 1972 (1976).
- 7) 日本化学会編 : “化学便覧, 基礎編 II”, p. 556 (1966), (丸善).
- 8) 日本分析化学会関東支部編 : “公害分析指針 4 (水・土壌編 1-a)”, p. 2 (1972), (共立出版).
- 9) 重松恒信, 松井正和, 藤野 治 : 本誌, **22**, 1162 (1973).
- 10) 山本勇麓, 熊丸尚宏, 鎌田俊彦, 田中俊行 : 衛生化学, **21**, 71 (1975).
- 11) 山本勇麓, 熊丸尚宏, 鎌田俊彦, 田中俊行, 川辺まゆみ : 日化会誌, **1975**, 836.

☆

Simultaneous determination of cadmium and copper in water by a graphite furnace-dual channel atomic absorption spectrophotometry. To-shiyuki TANAKA, Yasuhisa HAYASHI and Masaichi ISHIZAWA (Department of Public Health, Tottori Uni-

versity School of Medicine, 86, Nishimachi, Yonago-shi, Tottori)

A simple and rapid method was investigated for the determination of ppb levels of cadmium and copper in water, by a dual channel atomic absorption spectrophotometry with electrothermal atomization. The optimum operating conditions on the simultaneous determination were as follows: drying at *ca.* 180°C for 30 s, ashing at *ca.* 470°C for 60 s, atomization at *ca.* 2700°C for 10 s, and argon flow rate of 3 l/min. Sample solutions were acidified with nitric acid, because both cadmium and copper signals became maximal and constant over the range of 0.1 to 0.5 N in nitric acid and the addition of nitric acid was effective to decrease the non-specific absorption caused by sodium or potassium chloride. For sample volumes of 20 μ l, the calibration graphs were linear up to 2.5 ppb for cadmium and up to 250 ppb for copper. The relative standard deviations of 2.4% and 1.4%, respectively, were obtained at the analytical levels of 2.0 ppb for cadmium and 200 ppb

for copper. On the determination of cadmium, the permissible amounts of some diverse ions, such as K^+ and Pb^{2+} , increased greatly by making use of the peak-area instead of the peak-height as a measure of absorbance. This method was applied to the analysis of river and waste water, and the results were in good agreement with those obtained by the background correction method.

(Received Mar. 13, 1978)

Keywords

Atomic absorption spectrophotometry

Cadmium

Copper

Graphite furnace atomizer

Simultaneous determination

Water

高速液体クロマトグラフィー用高粘度スラリー充てん法

野村 明, 森田弥左衛門, 小暮 幸全*

(1978 年 3 月 6 日受理)

高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC と略記) における高粘性溶媒を用いるスラリー充てん法について検討した。球形シリカゲルを用いる吸着クロマトグラフィー用カラムは流動パラフィン-*n*-ヘキサン系溶媒を, ODS-シリカゲルを用いる逆相クロマトグラフィー用カラムはグリセリン-エタノール系溶媒を使用して充てん圧, スラリー溶媒の粘度, 充てん流速などの影響について検討した。その結果, 高粘性溶媒による高圧充てん法で効率の良いカラムが得られることが判明した。又, 本法を粒径の異なる球形シリカゲルの充てんに応用し, 平衡スラリー法とカラム効率を比較した結果, ほぼ同程度の効率が得られることが認められた。

1 緒 言

最近の HPLC の発展は, 機器及び充てん剤の改良に負う所が大であるが, カラム充てん法により, 得られるカラムの効率は非常に影響される。乾式充てん法は主に粒径の大きな充てん剤 ($>50 \mu m$: 破碎型¹⁾²⁾, $>30 \mu m$: 球形³⁾, $>(20\sim37) \mu m$: 大口径カラム⁴⁾) の充てんに用いられていたが, 充てん剤の粒径が小さくなるに伴い, 最近はほとんどすべて, スラリー充てん法が用いら

れている。その方法は多種多様であり, スラリー溶媒の種類により, 平衡スラリー法^{5)~9)}, 非平衡スラリー法^{10)~19)}, 高粘度スラリー法²⁰⁾, 充てん方法の相違により, ダイナミックスラリー法¹⁷⁾²¹⁾²²⁾, 上方スラリー法¹⁷⁾²³⁾, などに分類が可能ではあるが, いずれの方法においても, 高圧 $\{(140\sim700) \text{ kg/cm}^2\}$ で充てんすることにより, 効率の良いカラムが得られる点は一致している。これまでの充てん法の研究より, 高効率の分離能の高いカラムとは, 充てん剤が, カラムの縦方向及び横方向に粒径分布を持たず, 均一にしかも密に充てんされたカラムといえる。粒径の相違によるカラムの縦方向の粒

* 工業技術院東京工業試験所: 東京都渋谷区本町 1-1-5