生体試料中の微量ヒ素の迅速原子吸光分析法—アルシン—アルゴン・水素フレイム系

鎌田俊彦, 奥田久徳,^{1a)} 熊丸尚宏, 山本勇麓^{1b)}

広島大学医学部衛生学教室,^{1a)} 広島大学理学部化学教室^{1b)}

Rapid Atomic Absorptiometric Determination of a Small Amount of Arsenic in Biological Samples—By Arsine-Argon · Hydrogen Flame System

TOSHIHIKO KAMADA, HISANORI OKUDA,^{1a)}

TAKAHIRO KUMAMARU and YUROKU YAMAMOTO^{1b)}

Department of Hygiene, Faculty of Medicine, Hiroshima University^{1a)}

and Department of Chemistry, Faculty of Science, Hiroshima University^{1b)}

(Received June 18, 1973)

An atomic-absorption spectrophotometry for rapid, sensitive, and precise determination of arsenic in biological samples is described. Arsine can be rapidly evolved from arsenic solution in 2 N hydrochloric or sulfuric acid by using zinc powder tablets together with potassium iodide and stannous chloride solution as the reductant. Thus, arsenic can be determined by atomic-absorption spectrophotometrically by introducing arsine into an argon-hydrogen flame and reading the absorption signal of arsenic at 1937 Å.

To obtain optimum conditions for the determination of arsenic in biological samples, various factors were examined. The optimum range of acidity was about 1.5–3 N in hydrochloric acid when potassium iodide and stannous chloride concentrations were kept at 1.6 % and 0.8 %, respectively. The addition of at least one piece of zinc tablet (about 0.5 g) was enough to obtain the highest and constant recovery of arsenic as arsine. The sensitivity of the method for 1 % absorption was evaluated to be 0.7 ppb of arsenic and linearity of the absorption *vs.* concentration was good up to 1 µg/20 ml (50 ppb). Effect of several ions on the method was also examined. Satisfactory results were obtained by applying the proposed method to the analysis of arsenic in several biological materials, which were previously digested by a conventional method using sulfuric-nitric acid mixture.

ヒ素は古くから知られている有毒な元素の1つであるが、自然環境に広く分布しており、また、食品添加物などの中の不純物として、あるいは農薬残留物などとして食品中に混入する可能性もある。したがって、ヒ素による生活環境の汚染と関連して、尿、血液、毛髪などの生体試料中の微量のヒ素を迅速にかつ精度よく分析する方法を確立することは、きわめて重要な意義をもっている。とくにヒ素の健康に係わる環境基準は 0.05 ppm で

あり、感度と選択性の高い分析法が要求される。ヒ素の定量法としては従来からグトッアイト法、モリブデンブルー法、ジエチルジチオカルバミン酸銀法などの比色定量がよく知られている。²⁾ このうち、グトッアイト法は簡便ではあるが精度が低い。また、モリブデンブルー法は感度、精度とも不良で、かつ、リンやケイ素が妨害するので選択性に乏しく、河川水などの分析には不適當である。ジエチルジチオカルバミン酸銀法は、これらの方法のうちでは最もすぐれていると思われ、JIS にも採用

- 1) Location : a) *Kasumi-chō, Hiroshima-shi* (広島市霞町) ; b) *Higashisenda-machi, Hiroshima-shi* (広島市東千田町) .
- 2) a) 工場排水試験方法, JIS K 0102, 1971, p. 139 ; b) “衛生試験法注解,” 日本薬学会編, 金原出版, 東京, 1965, p. 292 ; c) “公害分析指針 7, 食品編 1-b,” 日本分析化学会関東支部編, 共立出版, 東京, 1972, p. 19.

されている。しかし、この方法は亜鉛粒を用いてヒ化水素を発生させるのに約1時間の長時間を要する。さらにヒ化水素による還元作用で生成する銀のコロイド液の赤色強度を測定するので、吸収液の種類や温度、吸収装置の形状、吸収のやり方などが微妙に影響して精度が悪く、検量線の日内変動が大きい欠点があることはよく知られている。

原子吸光定量法は多くの金属元素を簡便に、かつ、高感度で定量できる長所をもっているが、ヒ素はヒ素(III)またはヒ素(V)の水溶液から空気-アセチレンフレイムに直接噴霧する場合、原子化され難いことと、ヒ素の共鳴線が紫外部にあるためにフレイムの吸収によるバックグラウンドが高いことが相まって、通常のフレイム原子吸光法においては不適当な元素とされていた。

最近、Holak³⁾はヒ素(III)を粒状亜鉛を用いてヒ化水素に還元し、このヒ化水素蒸気を液体窒素で捕集したのち、アルゴン-水素フレイムに導入することによって、直接にヒ素を原子吸光定量できることを報告した。その後、Dalton⁴⁾は亜鉛の小粒子を用いてヒ化水素の発生に要する時間を数分以内に短縮した。著者らはこの方法に注目して、亜鉛末錠剤を用いて詳細な検討を行なった。とくにヨウ化カリウムと塩化第1スズがヒ素のヒ化水素への還元過程におよぼす影響について明らかにし、またヒ素の定量のための基礎的条件についても検討し、水中のppbレベルのヒ素の迅速定量法を報告した。⁵⁾本研究では、この方法を生体試料中のヒ素の定量に応用するため、試料の前処理とその他基礎的定量条件について種々検討して実試料の分析を行なったところ、きわめて満足すべき方法であることがわかったので、ここに報告する次第である。

実験の部

試薬 1. ヒ素(III)標準溶液——三酸化ヒ素 (As_2O_3) 1.320 g (メルク製試薬特級) を 10N NaOH 溶液約 10 ml に溶かし、水で正確に 1000 ml にした (1000 ppm)。実験に際してはこの溶液を適宜希釈して用いた。

2. ヒ素(V)標準溶液——ヒ酸カリウム (KH_2AsO_4) 2.403 g (和光純薬製試薬特級) を水に溶かし、水で正確に 1000 ml にした (1000 ppm)。実験に際してはこの溶液を適宜希釈して用いた。

3. 塩化第1スズ塩酸溶液 (10 w/v %)——塩化第1スズ ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 10 g を HCl に溶かして 100 ml に

した。

4. ヨウ化カリウム溶液 (40 w/v %)——ヨウ化カリウム 40 g を水に溶かして 100 ml にした。

5. 亜鉛末錠剤——無ヒ素亜鉛末 (片山化学製試薬特級) 50 g とバインダー粉末 (日本ジャーレル・アッシュ製) 4 g を乳鉢中でよく混合し、水 10 ml を加えてペースト状にする。このペーストをアルミニウム製の成型板 (穴の直径 6 mm, 厚さ 3 mm) につめ、電気乾燥器中で乾燥させる。錠剤1個の重量は約 0.5 g である。

6. 硝酸——市販の精密分析用試薬 (和光製) をそのまま用いた。

その他の試薬はすべて試薬特級品をそのまま用いた。水はすべてイオン交換水を用いた。これらの試薬溶液の容器はすべてポリエチレン製のものを使用した。

装置 1. 原子吸光分析装置——日本ジャーレル・アッシュ製 AA-1 EW 型を使用した。バーナーは水冷式 10 cm スリットバーナーを用い、アルゴン-水素フレイムを使用した。光源はウェスチングハウス製ヒ素中空陰極ランプを使用した。

2. ヒ化水素の発生・捕集装置——日本ジャーレル・アッシュ製 SD-1 型を使用した。その概略を Fig. 1 に示す。

標準操作 1. 生体試料の分解法——試料の分解は

Fig. 1. Diagram of Apparatus Used for Arsine Generation

- (A): reaction bottle
(B): balloon type collection vessel
(C): four-way stopcock
(D): flow-meter
(E): pressure gage

3) W. Holak, *Anal. Chem.*, **41**, 1712 (1969).

4) E. F. Dalton, A. J. Malanoski, *At. Absorption Newslett.*, **10**, 92 (1971).

5) a) Y. Yamamoto, T. Kumamaru, Y. Hayashi, T. Kamada, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **46**, 2604 (1973); b) 山本勇龍, 熊丸尚宏, 林 康久, 鎌田俊彦, 分化, **22**, 876 (1973).

文献^{2c)}に準じて操作した。すなわち、試料 0.5—20 g を 300 ml 容量のケールダール・フラスコにとり、水 20 ml を加えたのち、 HNO_3 10 ml を加えて砂皿上で暫時加熱後、放冷し、 H_2SO_4 5 ml を加えて再び加熱する。フラスコ内の溶液の色が褐色に変わりはじめたら、ただちに加熱をやめ放冷したのち、さらに HNO_3 5 ml を加え、再び加熱を続ける（この際、試料が炭化するとヒ素が揮散するため、炭化させないように注意する）。なお、血液などのような脂肪を多く含む試料については、 HNO_3 を加える前に 30% H_2O_2 水 5 ml を徐々に加え、激しい泡立ちがおさまったのちに、 HNO_3 5 ml を加えるのがよい。この分解操作は SO_3 の白煙が出はじめ、 HNO_3 が完全に駆除されても、分解液の色が無色または淡黄色になるまで上記のような HNO_3 の添加を繰り返す。冷却後、分解液を容量 100 ml のビーカーに移し、水約 50 ml を数回に分けてケールダール・フラスコをよく洗浄し、洗液も分解液に加える。10N NaOH 15 ml を加えて液性を弱酸性 (pH 1.5—2.0) に調節する。この際、pH が 2.2 以上になると水酸化鉄が生成し、ヒ素が共沈して損失するので、pH を 2.0 以上に上げないように注意する必要がある。つぎにこの溶液を容量 100 ml のメスフラスコに洗い移し、水を加えて正確に 100 ml とする。

2. 分解液中のヒ素の定量——ヒ素 1 μg 以下を含む検液 1—20 ml を Fig. 1 の反応容器 (A) にとり、水を加えて全量を 20 ml にする。この溶液に HCl 2 ml, ヨウ化カリウム溶液 1 ml および塩化第 1 スズ塩酸溶液 2 ml を加えてよく混ぜ合わせる。ついで反応容器をヒ化水素発生器内に置き、亜鉛末錠剤 2 個を加えて手ばやく反応容器をヒ化水素ガス捕集容器 (B) に連結する。ついでマグネチックスターラーを作動させてかき混ぜつつヒ化水素ガスを発生させ、90 秒間ガス捕集容器にヒ化水素を捕集する。つぎに四方コック (C) を“スweep”位置にまわして、補助アルゴンガスを反応容器を経て捕集容器へ流して捕集したヒ化水素ガスを瞬間的にアルゴン-水素フレーム中へ導入する。このとき同時に記録計を作動させてヒ素の原子吸光値を測定する。別にまったく同じように調製した試薬ブランク溶液について同様に測定し、ブランク値を差し引いて試料中のヒ素量を求める。原子吸光の測定条件はつぎのとおりである。

波長: 1937 Å

スリット幅: 0.1 mm

ランプ電流: 15 mA

アルゴン流量: 8.0 liter/min (1.5 kg/cm²G) (空気流量計の目盛の読み)

水素流量: 7.0 liter/min (0.4 kg/cm²G) (アセチレン

流量計の目盛の読み)

補助アルゴン流量: 4.0 liter/min (2.0 kg/cm²G)

検量線 標準操作のヒ素定量法に従って、ヒ素(III)標準溶液を用いて操作し、検量線を作成した。その結果は Fig. 2 のとおりで、1.0 $\mu\text{g}/20\text{ ml}$ (50 ppb) 以下で良好な直線関係が得られた。この際、ヒ素を添加しない場合にも小さな吸収ピークが得られる。これは HCl , 亜鉛末錠剤, ヨウ化カリウム, 塩化第 1 スズなどの試薬中の不純物ヒ素に起因する吸収ピークと考えられる。なお、分解試料溶液にヒ素を標準添加して得られた直線は検量線と平行であった。したがって、実試料の分析では検量線法をそのまま適用できることがわかった。本法の感度は 1% 吸収で 0.7 ppb であり、さらに 50 ppb のヒ素溶液について本法の精度を 10 回の繰り返し実験によって求めたところ、相対標準偏差は 2.6% であった。ヒ素(V)の標準溶液を用いても、まったくヒ素(III)と同様の結果が得られた。このことから、本法は従来のヒ素の分析法に比べれば感度、精度とも非常に高いものであることがわかった。

Fig. 2. Absorption Signal vs. Concentration of Arsenic

定量条件の検討 1. ヒ化水素発生におよぼす酸性度の影響——標準操作のヒ素の定量法において、ヨウ化カリウムおよび塩化第 1 スズの共存下でヒ化水素を発生させる際の酸性度の影響を HCl 溶液を用いて検討した。その結果を Table I に示す。ヒ化水素による一定の吸光値を得るために必要な酸性度は、1.5—3N 塩酸酸性であることがわかった。酸性度が 3N をこえると、水素ガスが多量に発生して捕集容器 (Fig. 1 の B) 内の圧力が非常に高くなり、得られる吸光値の変動が大きくなる。なお、 HCl のかわりに H_2SO_4 を用いて同様の検討

TABLE I. Effect of Acidity on the Reduction of Arsenic

Hydrochloric acid concn. (N)	Absorbance
1.0	0.315
1.25	0.320
1.5	0.325
1.75	0.325
2.0	0.323
2.25	0.328
2.5	0.325
3.0	0.330

arsenic: 1.0 $\mu\text{g}/20\text{ ml}$

を行なったところ、同じ酸性度ではまったく同一の吸光値が得られた。

2. ヒ素の還元におけるヨウ化カリウムおよび塩化第1スズの効果——ヒ素の還元におけるヨウ化カリウムおよび塩化第1スズの効果を検討した。その結果、標準操作のヒ素定量法において、(1)還元剤として亜鉛末錠剤のほかはヨウ化カリウムおよび塩化第1スズのいずれも存在しないときは両者が共存する場合に比べてヒ素(III)からはヒ化水素の収率が約1/6であり、ヒ素(V)からはまったくヒ化水素が生成しなかった。(2)ヨウ化カリウムが存在しないと、ヒ素(III)からは約1/2、ヒ素(V)からは約1/6の収率であった。(3)塩化第1スズが存在しない場合はヒ素(III)およびヒ素(V)のいずれも約1/2の収率であった。(4)ヨウ化カリウムおよび塩化第1スズの両者が共存すると、ヒ化水素の発生量が最大となり、しかもヒ素(III)とヒ素(V)のいずれの場合も一定の吸光値を与えた(Table II)。

TABLE II. Effect of Potassium Iodide and Stannous Chloride on the Reduction of Arsenic (Absorbance Value)

Arsenic	Zn	Zn+KI	Zn+SnCl ₂	Zn+KI+SnCl ₂
As(III)	0.056	0.163	0.158	0.325
As(V)	0.000	0.155	0.063	0.325

Zn: 2 tablets, KI: 1.6 %, SnCl₂: 0.8 %, HCl: 2N, arsenic (III or V): 1.0 $\mu\text{g}/20\text{ ml}$

以上のことから、ヨウ化カリウムおよび塩化第1スズの存在は、いずれもヒ素(III)およびヒ素(V)からヒ化水素への還元を促進する役割を果しており、顕著な正の寄与を与えることが明らかである。そこで2N HCl酸性において両試薬の一方の濃度を固定し、他方の添加量を変化させて好適な濃度を検討したところ、Table III および Table IV に示すようにヨウ化カリウム濃度は0.4 %

TABLE III. Effect of Potassium Iodide Concentration on the Reduction of Arsenic

Potassium iodide concn. (%)	Absorbance
0.0	0.158
0.4	0.328
0.8	0.325
1.2	0.330
1.6	0.325
2.4	0.325
3.2	0.322
4.0	0.330

arsenic: 1.0 $\mu\text{g}/20\text{ ml}$

TABLE IV. Effect of Stannous Chloride Concentration on the Reduction of Arsenic

Stannous chloride concn. (%)	Absorbance
0.0	0.162
0.2	0.325
0.4	0.322
0.8	0.325
1.2	0.328
1.6	0.320

arsenic: 1.0 $\mu\text{g}/20\text{ ml}$

以上、また、塩化第1スズ濃度は0.2 %以上に保てばよいことがわかった。

3. 亜鉛量の影響——標準操作のヒ素定量法において、ヒ化水素の発生におよぼす亜鉛量の影響を検討した結果をTable Vに示す。亜鉛末錠剤は1個でじゅうぶんであるが、念のため、この実験では亜鉛末錠剤を2個添加することにした。

TABLE V. Effect of Number of Pieces of Zinc Tablet on the Reduction of Arsenic

Zinc tablet (number of pieces)	Absorbance
0.5	0.290
1	0.325
2	0.325
3	0.322
4	0.328
5	0.320

arsenic: 1.0 $\mu\text{g}/20\text{ ml}$, zinc: 0.5 g/tablet

4. 反応時間の影響——標準操作のヒ素定量法において、亜鉛を添加してからガスを捕集してフレイムに導入するまでの時間の影響を検討した結果をTable VIに示す。反応時間が60秒以上で最大かつ一定の吸光値が得ら

TABLE VI. Effect of Reaction Time on the Reduction of Arsenic

Time (min)	Absorbance	Time (min)	Absorbance
0.5	0.290	2	0.322
1	0.328	3	0.330
1.5	0.325	4	0.325

arsenic: 1.0 $\mu\text{g}/20\text{ ml}$

れるが、この実験では反応時間を約90秒に保つことにした。

5. 共存物質の影響——各種陽イオンおよび陰イオンがヒ素の定量にどの程度影響を与えるかについて標準操作法に従って検討した。

セレン(IV)はかなり妨害し、ヒ素の7倍量、また鉛、アンチモン(III)、硫化物の各イオンは、それぞれヒ素の150倍、220倍、200倍以上存在すると負の誤差を与える傾向が認められた。その他のイオン (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Te^{4+} , Bi^{3+} , NH_4^{3+} , Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- , NO_2^- , CH_3COO^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , CN^- , SCN^- , BO_3^{3-} , MnO_4^- , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, MoO_4^{2-} , WO_4^{2-}) はヒ素に対して5000倍でも何ら妨害しなかった。

生体試料中のヒ素の定量 尿、血液、毛髪、爪、人乳などの生体試料を標準操作に従って $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HNO}_3$ 混酸を用いて分解し、ヒ素の定量を行なった。各試料の前処理および採取量は次のとおりである。

尿、血液、人乳：尿、血液および人乳は前処理をすることなく、それぞれ20 ml, 10 gおよび20 gを採取した。

毛髪、爪：毛髪および爪は洗剤で洗ったのち、よく水洗し、風乾した。試料として、それぞれ1 gおよび0.5 gを採取した。

その定量結果を Table VII に示す。

つぎに尿および血液に一定量のヒ素標準溶液を加えて標準操作法に従って分解処理したのちヒ素を定量し、ヒ素標準溶液を加えない場合の定量値と比較して、ヒ素の回収率を検討した。その結果は Table VIII に示すとおりで、回収率は106%であった。これより試料の分解過程においてはヒ素の損失はないことが確認された。

結 語

尿、血液、毛髪、爪、人乳などの生体試料に対するヒ素の原子吸光分析法を研究した。本法は試料を $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HNO}_3$ 混酸で分解後、分解液中のヒ素を亜鉛末錠剤とヨ

TABLE VII. Analytical Results of Arsenic in Several Kinds of Biological Samples

Sample	Arsenic found (ppm)
Urine A	0.090
Urine B	0.088
Urine C	0.110
Urine D	0.119
Urine E	0.292
Urine F	0.152
Milk A	0.020
Milk B	0.010
Milk C	0.029
Blood A	0.079
Blood B	0.179
Hair A	0.80
Hair B	0.69
Hair C	1.02
Nail A	2.31
Nail B	2.51
Nail C	2.08

TABLE VIII. Results of the Recovery Test of Arsenic

Sample	As added (ppm)	As found (ppm)		Devia- tion (ppm)	Recovery (%)
		obtained	mean		
Urine	—	0.118	0.119	0.085	106
	—	0.124			
	—	0.116			
	—	0.117			
	0.080	0.204	0.204		
	0.080	0.206			
	0.080	0.202			
	0.080	0.204			
Blood	—	0.079	0.079	0.408	106
	—	0.094			
	—	0.067			
	—	0.077			
	0.385	0.501	0.487		
	0.385	0.491			
	0.385	0.472			
	0.385	0.482			

ウ化カリウムおよび塩化第1スズを還元剤に用いてヒ化水素にかえたのち、直接アルゴン-水素フレームに導入してヒ素を定量する方法である。この方法は3価または5価のヒ素に関係なく、迅速かつ高感度で精度よくヒ素の定量ができる点に特徴がある。セレン、鉛、アンチモン、硫化物以外は多量に存在してもヒ素の定量を妨害しない。数種の生体試料中のヒ素の定量に本法を応用し、満足すべき結果が得られた。