短 報

トルエン抽出・フレイムレス原子吸光法による
生体試料中鉛およびカドミウム定量法の簡便化A Simplified Method for the Determination
of Lead and Cadmium in Biological
Materials by Flameless Atomic
Absorption Spectrometry Using
Toluene Extraction

Key words : lead; cadmium; blood; urine; hair;
flameless atomic absorption spectrometry

血液, 尿, 毛髪など生体試料中の鉛(Pb), カドミウム(Cd)の測定に用いられるフレイムレス原子吸光法には, 1) 希釈試料, 灰化試料, 除蛋白試料などを直接分析する方法¹⁻³⁾と2) 溶媒抽出により目的とする金属と妨害物質を分離して分析する方法⁴⁾の2つの方法がある。

1) は簡便ではあるが, 希釈操作や酸などの影響により分析感度が低下し, 試料の粘度や共存物質の影響により分析値がばらつきやすい。これに対し, 2) は精度, 正確度に優れるが, 操作が煩雑で熟練を要した多数の検体処理が困難である欠点がある。そこで試験管湿式灰化・トルエン抽出法を考案して, その実用性を検討した。

方 法

血液 0.5 ml, 尿 2 ml, 毛髪 25 mg をネジロ試験管(18 mmφ×180 mm, バイレックス製)に取り, 混酸(硝酸 24:60% 過塩素酸 24:硫酸 1)を1 ml 加え, ヒーティングブロック(ヤマト科学製)中で, 室温より140°C まで約30分かけて昇温した。試験管を時々振り混ぜながら30分放置後, 200°C まで約1時間かけて上昇させ, 白煙が生じるまで濃縮した。冷却後, 蒸留水を加えて析出物を溶解後, 30% クエン酸二アンモニウム液, 10% トリエタノールアミン液各0.5 mlを加え, アンモニア水(13%)でpH 9付近に調節した(指示薬, *m*-クレゾールパープル)。10% 塩酸ヒドロキシルアミン液0.5 mlを加えて蒸留水で約15 mlとした後, 0.1% ジチゾン・トルエン液1 mlを加えて1分間混和した。20分間静置後, 上層10 μlをフレイムレス原子吸光計炭素炉に注入した。

分析機器は, 島津 AA-610 s 型原子吸光計に炭素炉アトマイザー(炭素炉), 島津 GFA-2; 電源部, GFA-1)を接続して用いた。分析条件を Table 1 に示す。

結 果

1) 灰化時間: 試料と混酸の総量が3 ml 以下であれ

Table 1. Operating conditions.

	Pb	Cd
Wavelength	217.0 nm	228.8 nm
Slit width	0.19 nm	0.19 nm
Lamp current	10 mA	8 mA
Expansion	× 1	× 1
Recorder range	50, 100 mV	50 mV
H ₂ Flow rate	2.0 l/min	2.0 l/min
Drying	20 A, 10 sec	20 A, 10 sec
Ashing	95 A, 30 sec	55 A, 30 sec
Atomizing	220 A, 7 sec	260 A, 7 sec

※ Temperature in the graphite tube furnace was unknown as the atomizer of current control type was used.

Fig. 1. Calibration curves of lead (Pb) and cadmium (Cd). ●: water, ▲: blood, □: urine, ◆: hair. Samples were obtained from a healthy man aged 35 years. Hair sample was washed with acetone and water. Lead was added as $Pb(NO_3)_2$; cadmium as $CdCl_2$.

ばよほど急激に加熱しない限り突沸して試料が吹き出る恐れはなく, 灰化濃縮を3時間以内に完了することができた。

2) 抽出溶媒, pH 条件: 従来のジチゾン法の抽出溶媒として用いられているベンゼンおよび *m*-キシレンと今回使用したトルエンを比較した結果, フレイムレス測定の際のシグナルのピークの高さには差は見られなかった(*m*-キシレンはジチゾンを変色させた)。抽出量とpHの関係を検討した結果, PbはpH 8~9.6, CdはpH 3.4~9.6の範囲で最大かつ安定した抽出量が得られた。トルエン抽出後のPbおよびCdのキレートは安定で, 水層より分離せず, そのまま室温に放置しても24時間は濃度に変化がなかった。

3) 干渉: 鉄(III)が1 mg 共存してもフレイムレス法によるPb 60 ng およびCd 3 ng の測定に全く影響が見られなかった。

4) 検量線: 水溶液, 血液, 尿および毛髪に既知量を添加して作成した各検量線は, 勾配が一致し, 絶対検量線法による定量が可能と考えられた(Fig. 1)。なお, Cdのフレイムレス分析条件においてわずかなバックグラウンド吸収(吸光度: 0.01, Cd換算濃度: 0.3 ng/ml)が観察されたが, 標準水溶液, 試料に関係なく一定値を示すことから, ブランク値として差し引くことにより補正

Table 2. Results of recovery test for lead(Pb) and cadmium(Cd) in blood and urine in male workers aged 21-55 years. Lead was added as Pb(NO₃)₂; cadmium as CdCl₂.

Sample	Pb (ng/ml)				Cd (ng/ml)			
	Original	Added	Found	Recovery (%)	Original	Added	Found	Recovery (%)
Blood 1	59.7	120.0	173.4	93.4	1.52	6.00	6.93	90.2
2	170.7	120.0	294.4	103.1	3.25	6.00	9.35	101.7
3	74.0	120.0	194.6	100.5	2.63	6.00	8.03	90.0
4	66.3	120.0	182.9	97.2	1.13	6.00	7.20	101.2
5	96.2	120.0	208.3	93.4	2.60	6.00	9.04	107.7
6	70.5	120.0	188.9	98.7	1.56	6.00	7.21	94.2
7	57.5	120.0	178.2	100.6	0.68	6.00	6.51	97.2
n=98.3, S.D.=3.4					n=97.5, S.D.=6.5			
Urine 1	2.6	40.0	46.0	108.5	3.26	4.00	7.39	103.3
2	6.1	40.0	48.8	106.8	2.67	4.00	6.47	95.0
3	2.7	40.0	44.1	103.5	0.71	4.00	4.75	101.0
4	8.1	40.0	46.0	94.8	1.01	4.00	4.74	93.3
5	4.3	40.0	43	94.5	0.51	4.00	4.63	103.0
6	1.9	40.0	39.0	92.8	0.36	4.00	4.46	102.5
n=100.2, S.D.=6.9					n=99.7, S.D.=4.4			

n : Mean of recovery rate, S.D. : Standard deviation.

が可能と思われた。

5) 回収率, 再現性: 男子の鉛検診受診者の血液, 尿による添加回収試験では, ほぼ 100% の成績が得られた (Table 2)。標準添加血を分析して求めた繰返し精度 (n=15) は, Pb (平均濃度 93.1 ng/ml) は変動係数で 2.5%, また Cd (3.2 ng/ml) は 3.7% であった。

6) 正常値: 本法により四国在住の男子の高校生 46 名 (年齢 17~18 歳) の血液, スポット尿中 Pb および Cd 濃度を測定した結果を Table 3 に示す。

考察および結論

本法は少量の試料で前処理操作を全て一本の試験管内で行うことができ, 多数検体の同時処理が極めて容易となる点が従来の溶媒抽出法より優れている。灰化に使用したヒータリングブロックは 40 検体用であるが, 台数を増やす事によりさらに多くの検体の処理が可能となる。前処理に要する時間も抽出操作を含めて約 4 時間であり, Watanabe ら²⁾ の試験管湿式灰化法や Elinder ら³⁾ の除蛋白法よりはるかに迅速である。生体試料中に多量に存在する鉄は, クエン酸二アンモニウムとトリエタノールアミンの添加⁵⁾ により容易に隠ぺいできるため, 鉄の抽出除去操作⁴⁾ なども不要である。また, 抽出溶媒として使用したトルエンは, 従来のジチゾン法において抽出溶媒に使用されているベンゼンやクロロホルムより低毒性である。また, 絶対検量線法が適用でき, 良好な分析精度が得られる。

Table 3. Concentrations of lead(Pb) and cadmium(Cd) in blood and urine in male senior high school students aged 17-18 years in the Shikoku region.

	Pb		Cd	
	Blood (μg/l)	Urine (μg/l)	Blood (μg/l)	Urine (μg/l)
N	46	46	46	46
GM (μg/l)	49	4.9	0.6	0.5
GSD	1.30	1.42	1.80	1.53
Range (μg/l)	30~78	2.5~11.3	0.1~2.1	0.2~1.5
r	0.67 (P<0.01)		0.42 (P<0.01)	

※ Blood samples were taken by venipuncture using disposable syringes and needles.

† Corrected to a specific gravity of 1.024.

GM : Geometric mean, GSD : Geometric standard deviation.

r : Correlation coefficient between blood and urinary concentrations.

以上より本法は, Pb, Cd などの低濃度暴露作業や環境汚染による人体負荷量など, 低レベルの生体試料の測定に適した方法であると考えられる。

本研究の一部は第 58 回日本産業衛生学会で発表した。

文 献

- 1) Hwang JY, Ullucci PA, Mokeler CJ. Direct flameless atomic absorption determination of lead in blood. Anal Chem 1973; 45: 795-798.
- 2) Watanabe T, Fujita H, Ikeda M. A semiautomated system for analysis of metals in biological materials and its application to mass determination of cadmium in blood. Toxicol Lett 1982; 13: 231-238.
- 3) Elinder CG, Friberg L, Lind B, Jawaid M. Lead and cadmium levels in blood samples from the general population of Sweden. Environ Res 1983; 30: 233-253.
- 4) 松本久男. Oxin-MIBK, APDC-MIBK 抽出グラフアイト・チューブ原子吸光法による毛髪中鉛の微量定量. 産業医学 1982; 24: 298-304.
- 5) 松本 勲, 高林稔雄, 中村 烈. 原子吸光分析法による酸化鉄中微量鉛の定量. 分析化学 1970; 19: 771-775.

須那 滋*, **, 中嶋泰知**

* 四国鉄道病院保健管理部

** 香川医科大学人間環境医学講座

Shigeru SUNA*, ** and Taichi NAKAJIMA**

* Health Service Division, Shikoku Hospital of Japan Railways, 2-30 Nishiuchi-machi, Takamatsu, 760 Japan

** Department of Environmental Medicine, Kagawa Medical School

昭和 60 年 12 月 26 日受付

通信先: 須那あて. Reprint requests to S. Suna