

フレイムレス原子吸光法による血中鉛の測定

藤代 良彦 福島 悦子 日野 隆信

The Measurement of Lead in Blood by Flameless Atomic Absorption Spectrometry

Yoshihiko FUJISHIRO, Etsuko FUKUSHIMA and Takanobu HINO

I はじめに

生体試料中の微量元素の中で鉛の分析は精度、再現性にまだ多くの問題を残している。ことに血液試料では、試料量は1~2 ml程度であり、鉛含有量も数十 ppb程度と少なく、原子吸光分析の検出限界附近での再現性をいかに良くするかが焦点となる。

今回著者らは、血液を試料として、前処理行程は行なわず、標準添加-直接フレイムレス原子吸光法による血中鉛の測定における、問題点を把握することを目的とし、実験を行なったので報告する。

II 機器及び試薬

2.1 装置

パーキンエルマー製原子吸光分光装置M-4000にフレイムレスアトマイザ-HGA400, オートサンプラAS-40を組み合せを用いた。出力は日立製2ペンコーダ561型およびキャノン製パーソナルコンピュータBX-1で記録した。分析条件はTable 1に示す。

2.2 試薬

- 1) 精製水: ヤマト科学製WF-12型により, イオン交換水を石英二段蒸留を行なった。
- 2) 硝酸: 原子吸光分析用
- 3) 界面活性剤: Tween60
- 4) 鉛標準原液(1 ml=1 mg Pb): 特級硝酸鉛1.599 gを硝酸10 mlと精製水90 mlとの混合液に溶かし, 精製水を加えて1 ℓとする。
- 5) 鉛標準液: 鉛標準原液を0.1 N硝酸で希釈して所定の濃度とする。
- 6) 試料調製用希釈液: 精製水約500 mlに界面活性剤1 mlと硝酸7 mlを溶かし, 精製水を加えて1 ℓとする。

2.3 器具の洗浄

- 1) ガラス器具: 購入したガラス器具は超音波洗浄機でアルカリ性洗浄液による洗浄を行なった後, 水洗し, 約80°Cに加熱した(1+2)硝酸(特級品)浴の中に数時間入れる。その後イオン交換水(蒸留水をイオン交換樹脂に通したもの)で十分に洗

Table 1. Analytical Conditions for Atomic Absorption Spectroscopy.

Spectrometer Parameters		HGA Parameters							
Wavelength	: 283.3nm	Graphite Tube	: Pyrolytically Coated						
Spectral Bandwidth	: 0.7nm	Sample Aliquot	: 20 μ l						
Light Source	: Hamamatsu L233-Pb	Purge Gas	: Argon						
Current	: 10mA								
Background Correction	: D ₂ Lamp	STEP	1	2	3	4	5	6	7
Peak Monitoring Time	: 4 sec	Temp (°C)	80	90	100	110	550	2100	2600
		Ramp (sec)	10	10	10	20	10	1	1
		Hold (sec)	10	20	40	10	20	5	3
		Read							Yes
		Record							Yes
		Baseline (sec)					20		
		Ar Flow (ml/min)	310	310	310	310	310	50	310

浄し、さらに精製水で洗浄する。

その他のガラス器具は超音波洗浄機でアルカリ性洗浄液による洗浄を行なった後に水洗し、(1+4)硝酸(特級品)槽に一昼夜入れ、前と同様な水洗を行なう。

- プラスチック器具：イオン交換水で十分に洗浄したのち、小型超音波洗浄器の中に入れ、(1+4)硝酸(原子吸光用)を加えて、浮き上らないように液面に押え板をのせ、数時間超音波洗浄を行なう。精製水で十分に洗浄して、ほこりの入らない乾燥棚中で自然乾燥させる。

III 結果と考察

3.1 血中鉛灰化条件

血液試料を直接フレームレス原子吸光法で測定する際の灰化条件を選ぶにあたり、灰化温度と283.3nmにおけるバックグラウンド吸収および鉛原子吸収を検討した。50 ng Pb/ml (0.1 N HNO₃) 溶液、20%血液/0.1% Tween60+0.1 N HNO₃ 及び20%血液/0.1% Tween60を用い、灰化温度を変化させた時の原子化時のバックグラウンド吸収と鉛吸収をFig.1に示す。なお鉛吸収はAA-BG吸光度(左辺目盛)で、BG吸収は記録紙上のピーク高(右辺目盛)である。BG吸収は500℃以上の灰化条件では一定するが、標準試料で550℃までは鉛吸収の減少(灰化時のロス)が認められなかった。又血液を均一に希釈する目的で0.1%

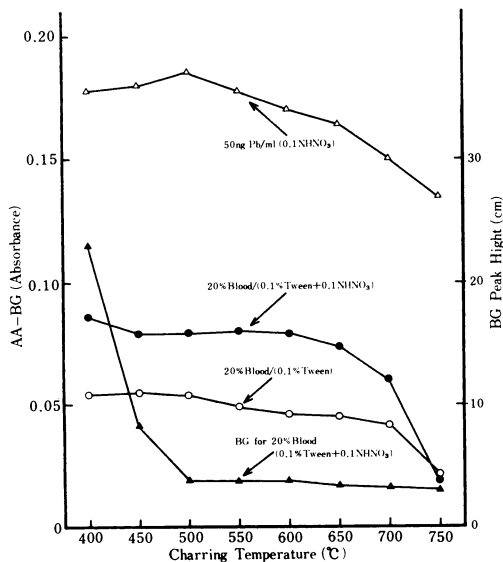


Fig.1. Lead in Blood Determination of Maximum Charring Temperature.

TWEEN60を用いたが、更に0.1N HNO₃を加えた場合には吸光度が高くなるのが解ったので以下の実験では灰化温度550℃、血液希釈溶液は0.1% Tween60+0.1N HNO₃溶液とした。

3.2 誤差と精度

標準添加法を用いて試料濃度を測定する際に問題となるのが濃度-吸光度の直線性と標準試料作製上の濃度誤差などがある。

Fig.2に当所において化学分析を担当する職員6名を選び、各々独立に作製した0, 10, 20, 50および100 ng/ml (0.1N HNO₃)の標準溶液を測定した結果を示す。なお図中の吸光度は濃度0から6名分を3回ずつ測定しその平均吸光度を表わす。又3名分を測定する毎にある人の作製した50ppb溶液を同様に測定して機器の経時変化の補正を行なった。Fig.2に示すように標準溶液の調整は標準物質の種類や調整方法によらず、その勾配はほぼ一定で、吸光度0.3までは直線性があるが、ブランク溶液は個人差がかなりあることが解った。ブランク値に差の出る要因は濃度勾配が各々一定であることから考えると、希釈液に問題があると考えられる。

又測定機器の経時変化は一定の傾向をとらず、全体

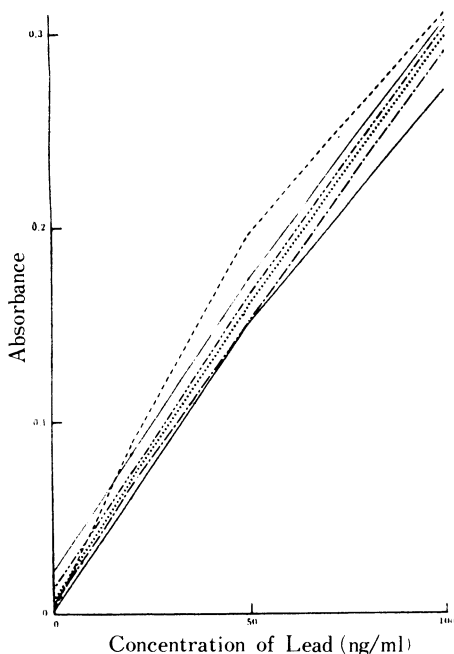


Fig.2. Calibration Curves for 6 Technicians.

を通して変動係数が2.2%であるので、経時的な機器の安定性は良好といえる。

2 ppb 標準液, 5 ppb 標準液および血液の1/5 希釈液の順にそれぞれ3回測定の平均吸光度を求め、これを9回くり返したのがFig. 3である。図に示すように血液試料においても、ことに測定再現性が悪くなるということはない。

次に、標準添加法では4点程度の添加が必要であるとすると、1 mlの血液で分析する為には個々の分析に0.25 mlしか使えないことになる。そこで少量のサンプリングに用いられるサンプリング誤差をマイクロピペットを用いて検討した。固定式および可変式マイクロピペットを用い、血液希釈液をそれぞれ5回サンプリングし秤量瓶にとって秤量した結果をTable2に示す。

サンプリングの絶対量は各々にファクターを求めておけば、

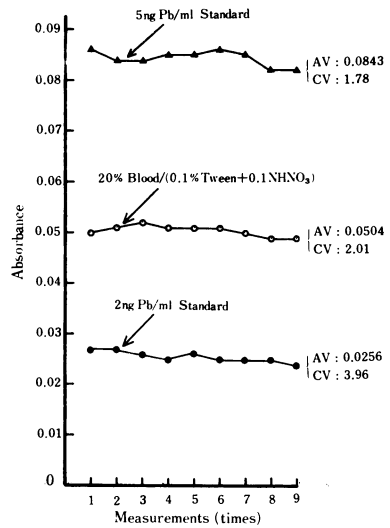


Fig.3. Reproducibility of Measurements.

Table 2. Precision of Micropipette.

Volume (μl)	Precision ; Average for 5 Times (mg) ± Standard Deviation (Coefficient of Variation)	
	Single Fixed Volume	Ajustable Volumes
50	49.15 ± 1.25 (2.5%)	53.87 ± 0.93 (1.7%)
100	99.88 ± 2.92 (2.9%)	105.80 ± 1.25 (1.2%)
200	199.21 ± 2.04 (1.0%)	204.72 ± 0.68 (0.3%)
300		306.04 ± 1.07 (0.4%)
400		405.87 ± 1.18 (0.3%)
500		506.39 ± 0.71 (0.1%)

Table 2に示すようにくり返しの精度は満足すべき結果であった。

さて、鉛分析を行なう際の突然のコンタミネーションが実験室雰囲気中からどの程度起るのかみたのがTable. 3である。1分間に1ℓの空気を0.1 NHNO₃溶液100 mlに通し、経時的に吸収液の鉛量を測定した。その結果時間とともに増加する傾向は認められず、通常業務を行なっている実験室で雰囲気からの鉛のコンタミネーションが起る心配は少ないと思われる。なお外気は3階外気である。

次に血液試料にPbを添加し、直線性の範囲と希釈による影響を検討した。血液 100 μl, 50 μlおよび 25 μlとりそれぞれ一定量の鉛を添加して 500 μlとし測定した結果をFig. 4に示す。1/5, 1/10および 1/20 希釈血液とも勾配は一定で、希釈率による干渉の変化は無いものと思われる。又吸光度0.3 附近までの直線性は実試料においても良好である。したがって血液試料で実際に測定する場合には希釈による誤差を少なくする様、1/5 希釈が適当であると思われる。

Table 3. Measurements of Lead in Air.

Bubbled time (hours)	Lead in 0.1NHNO ₃ solutions (ng/ml)	
	Laboratory Air	Outdoor Air
0		
1	9.0	4.2
2	9.4	3.9
3	9.2	3.2
4	9.5	3.2
5	9.2	3.5
6	9.3	4.0
7	10.3	4.3
8	9.2	4.8
9	9.6	4.1
10	9.6	5.1
11	9.7	

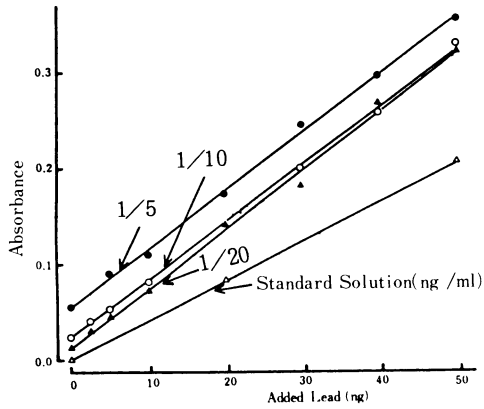


Fig.4. Calibration Curves of Standard Additions for Several Different Dilutions.

最後に調製試料の保存法と経時変化をFig.5に示す。前述の 1/5 希釈に調整した試料をそれぞれ凍結保存と室温保存し経時変化を調べた。その結果室温保存と凍結保存では差のないことが解った。いずれの場合も経時的に漸増傾向が認められた。

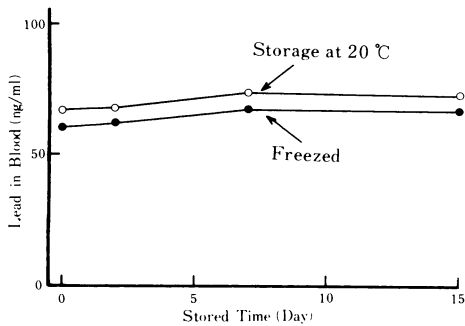


Fig.5. Variation of Analytical Values of Lead in Blood for Different Storage.

IV まとめ

血中鉛の測定は含有量が少ない上に入手試料量に制約があるために困難が多い。しかし標準添加-直接フレームレス原子吸光法により少量サンプルの測定が可能である。測定の再現性の良否は測定機器類にはよらず、コンタミネーションによる。わずかのコンタミネーションが測定値に影響し再現性および精度を悪くする。コンタミネーションは主として希釈水および器具に由来する。

なお添加試料は鉛添加量が少ない時、原子化時にショルダーを持つピークとして現われることが多いので、定量にはピーク高でなくピーク面積で検討する必要があるとともに、標準添加法は数多い試料の分析には測定回数が増加するので更に簡単で精度の良い分析方法の開発が望まれる。