

水素化物加熱原子化法による 生体内微量セレンウム(Se)の定量

関根健二・木村美恵子・糸川嘉則
(京都大学医学部 衛生学教室*)

Determination of selenium in biological samples by hydrogen selenide evolution electrothermal atomic absorption method

Kenji SEKINE, Mieko KIMURA and Yoshinori ITOKAWA
Department of Hygiene, Faculty of Medicine, Kyoto University

We adopted the rapid semi-automized electrothermal atomisation atomic absorption spectrophotometric procedure for determination of selenium in biological samples.

It was found that this method is one of the most sensitive techniques available for measuring the trace levels of selenium found in biological materials. Co-existence of high concentration of As, Ni and Cu interferes selenium determination. However, these interference is negligible in the case of determination in biological samples.

By animal experiment, it was clarified that the concentration of selenium in liver and kidney was highly responsive to the dietary selenium level, while it was poorly responsive in brain and testis.

生体内の微量元素であるセレンウム(Se)の欠乏によってラットの育成低下¹⁾, 羊の白筋病²⁾ 又は鶏の滲出性素質³⁾ など種々の症状が現われることが知られている。一方, Seは過剰摂取による毒性も問題となる⁴⁾。これらの研究の基本となるSeの定量法は従来, 比色法⁵⁾及びガス

*所在地:京都市左京区吉田近衛町(〒606)

クロマトグラフィー⁶⁾が用いられて来たが、操作の繁雑性や感度不足などの問題点がある。近年、これらの欠点を解消する方法として Se を水素化物に変換して測定する高感度定量法⁷⁾が報告されたが、今回、我々はこの水素化物加熱原子化・原子吸光法による生体内微量試料中 Se の定量について検討を加えた。

方 法

1. Se の水素化物原子化・原子吸光法に関する基礎実験

1) 試 薬

Se 標準液作成には酸化セレン (SeO_2) 140.5 mg を 100 ml の蒸留水に溶解、Se の 1000 ppm 溶液を作成する。試料灰化用には和光純薬製有害金属測定用硝酸、過塩素酸、硫酸及び塩酸を使用する。水素化物発生用試薬には特級の水酸化ナトリウム、水素化ホウ素ナトリウム及び塩酸を準備する。

2) 装 置

水素化物発生装置 (HYD-1)、水素化物原子化装置 (HYD-2) 及び原子吸光分光光度計 (AA-782) はいずれも日本ジャーレルアッシュ社製である。フローシェーマを図 1 に示す。HYD-1 の送液用のキャリアーガスには高純度アルゴンを用いる。

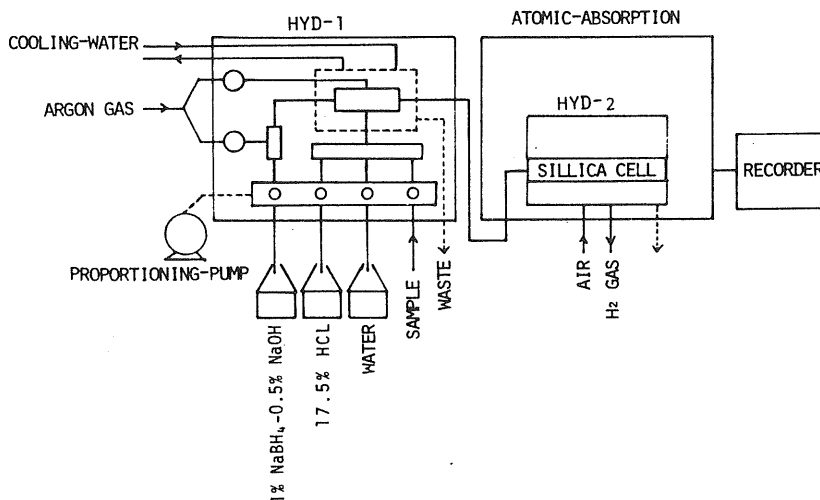


Fig. 1. Schematic diagram (selenium determination)

3) 灰化法

試料を 100 ml キエルダールフラスコに入れ、硝酸-過塩素酸、硝酸-硫酸、硝酸-過酸化水素又は塩酸-過塩素酸法にて湿式灰化を試みた。

4) 測定法

試料吸入口より吸入させた試料中 Se は HYD-1 で水素化物化, 引続き HYD-2 において 1000℃ で加熱原子化される。原子化された Se は 原子吸光分光光度計で波長 169 nm で測定する。

2. 実験動物及び試料

体重 50 g の雄 Wistar 系ラットを 4 匹宛 8 群に分け, 飼料中 Se 濃度が ① 0.02 $\mu\text{g/g}$, ② 0.05 $\mu\text{g/g}$, ③ 0.075 $\mu\text{g/g}$, ④ 0.1 $\mu\text{g/g}$, ⑤ 0.2 $\mu\text{g/g}$, ⑥ 0.5 $\mu\text{g/g}$, ⑦ 0.75 $\mu\text{g/g}$, 及び ⑧ 1 $\mu\text{g/g}$ になるような 8 種類の飼料を与えて, 2 週間飼育した。① は通常合成飼料として用いられる基本飼料であり, その組成は表 1 に示す通りである。飼育期間中, 飲用水は再蒸溜水を与えた。飼育 2 週間後, ペントバルビタール麻酔下にて採血, 直ちに各種臓器を摘出した。試料は硝酸-過塩素酸法にて湿式灰化を行なった。

Table 1. Composition of synthetic diet (1)

Casein	15.0 (%)
Sucrose	38.3
Starch	30.0
Olive oil	10.0
Cellulose	2.0
Salt mixture*	4.0
Vitamin mixture#	0.5
Choline chloride	0.2

* Salt mixture (ratio)

Vitamin mixture (in 1g)

NaCl	121.6	vitamin A palmitate	2500 IU
$\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	266.5	calciferol	200 IU
K_2HPO_4	87.0	dl- α -tocopherol	1 mg
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	400.0	thiamin nitric acid	1 mg
CaCO_3	184.0	riboflavin	1.5 mg
MgCO_3	46.0	nicotinamide	10 mg
$\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	18.0	pyridoxine hydrochloride	1 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.2	folic acid	0.5 mg
MnSO_4	1.4	pantothenic acid	5 mg
$\text{K}_2\text{Al}_2(\text{SO}_4)_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$	0.1	cyanocobalamin	1 μg
KI	0.05	ascorbic acid	37.5 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1		
ZnCO_3	0.05		

結 果 と 考 察

1. 水素化物発生及び加熱原子化の条件

種々検討の結果、下記の条件で最も良好な結果が得られた。

HYD-1 の条件ではキャリアーガス 1 は $0.2 \ell/\text{min}$ 、キャリアーガス 2 は $1.25 \ell/\text{min}$ の流速で流し、 HaBH_4 -NaOH 溶液は NaBH_4 10 g, NaOH 5 g を合わせて 1000 ml とする。塩酸溶液は濃塩酸と蒸留水 (V/V, 1:1) を混合して使用する。HYD-2 の炉の温度は 1000°C とし、原子吸光分光光度計 (波長 196 nm, 電流値 20 mA, スリット巾 3) で測定する。

2. 標準品の検量曲線

標準品 Se の検査曲線は図 2, 3 に示す通り、高濃度域でも、低濃度域でも非常に良い直線性を得られ、0.25 ppb まで検出可能であった。

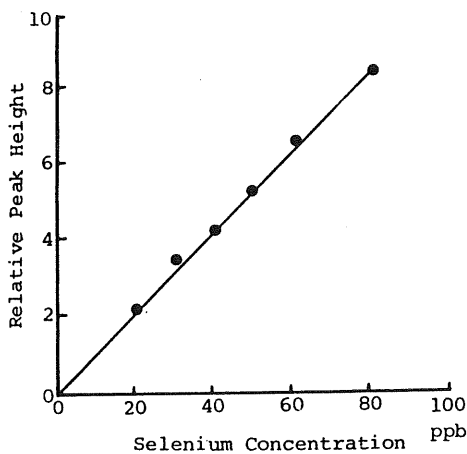


Fig. 2. Calibration graph obtained for selenium (high concentration)

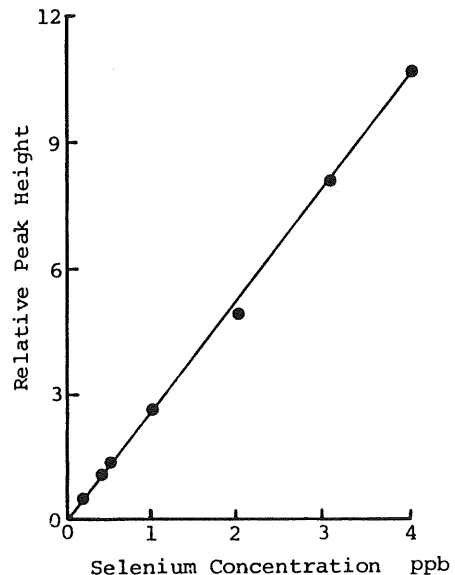


Fig. 3. Calibration graph obtained for selenium (low concentration)

3. 共存金属元素の影響

Se 測定に対する種々の金属共存の影響について検討した結果、Cu, Ni, As 及び Fe で干渉を示した。Cu は 500 ppb (W/V) の存在下で Se 濃度が 2 ppb の場合 32% の感度低下が認められたがラット組織中 Cu 濃度は 0.5~5 ppm であり、灰化後の試料を希釈することにより、実際の測定に弊害はないことが明らかとなった。Ni も 50 ppm 以上の高濃度において干渉を示したが生体試料では Ni が低濃度にしか存在しないため問題はない。As は 100 ppb 以上の濃度

で Se 測定への干渉が認められるが、通常の生体試料の濃度範囲では影響は認められなかった。次に、Fe の Se 測定への影響は灰化処理を行わない場合は 10ppb 位から干渉が現われるが灰化処理を行なうことにより干渉は全くなくなることが明らかとなった。

4. 回収率への灰化法の影響

Se 標準品を各種灰化法により灰化処理を行い、その回収率を調べた結果は表 2 に示す通りである。即ち、硝酸－過塩素酸法による湿式灰化が最も有効で約 100% の回収率が得られることが明らかとなったが他の方法では回収率が劣った。次に、試料への Se 標準品の添加回収率

Table 2. Recoveries of digestion methods

Digestion method	Se contents (ng)	Recoveries (%)
HNO ₃ + HClO ₄	400	110
		114
		114
	700	106
		110
		107
	1000	100
		107
		111
HNO ₃ + H ₂ SO ₄	400	81.8
	500	71.4
	700	63.8
HNO ₃ + H ₂ O ₂	400	69.1
	500	64.7
	700	57.0
HCl + HClO ₄	400	75.0
	500	66.0
	700	66.0

Table 3. Recovery rate of selenium

	Added Se contents (ng)	Found Se contents (ng)	Recoveries (%)
Blood 1 ml	0	600	
	300	892	99.2
	600	1250	104.5
	1000	1670	104.3
Liver 0.5 g	0	437	
	200	613	96
	400	875	104
	600	1152	111

Table 4. Selenium concentration of various tissues

	Se concentration of diets									
	1 ppm	0.75 ppm	0.5 ppm	0.2 ppm	0.1 ppm	0.075 ppm	0.05 ppm	0.02 ppm	(ng/g)	
Brain	253.0±48.4	244.6±47.4	231.0±25.3	157.0±21.4	200.0±24.9	177.3±17.9	173.5±14.4	141.6±18.5		
Thymus	441.0±106.3	391.2±99.7	322.5±43.4	306.4±56.7	342.0±39.5	296.0±11.2	249.6±26.6	225.7±10.8		
Lung	710.0±114.9	580.5±123.4	502.3±112.6	354.2±54.3	378.7±39.9	344.0±38.0	328.0±56.1	199.2±63.6		
Heart	603.8±87.6	486.0±30.6	419.3±48.2	402.2±76.1	345.5±81.3	320.8±14.9	301.5±29.0	220.0±39.3		
Liver	6545.8±1263	4460.5±648	3049.5±655	1434.8±149	1263.0±149	887.5±42.8	785.0±123.0	211.8±40.3		
Spleen	840.5±37.8	753.2±143.6	609.8±154.8	470.7±70.0	463.0±94.2	549.5±83.2	363.3±56.0	268.7±15.2		
Kidney	6775.5±3190	3449.2±822	2608.8±643	1440.2±159	1238.0±212	1129.0±120	1115.0±229	533.2±26.2		
Testis	641.8±63.4	631.4±112	549.8±83.4	521.8±64.8	515.3±55.0	606.7±98.3	447.3±37.3	496.8±55.3		
Muscle	251.5±30.0	220.5±38.0	185.5±22.0	144.2±10.3	120.3±8.4	134.3±4.7	116.0±21.2	75.8±8.3		
Bone	698.3±201	409.6±104	322.0±90.0	190.8±37.4	160.0±17.5	206.0±23.0	172.7±31.2	157.6±37.0		
Blood	1001.2±74.8	779.0±65.3	611.3±63.3	383.0±49.2	379.3±57.3	416.0±33.6	370.5±43.5	212.8±67.9		

Means ± S.E. n=4

について検討したところ、表3に示す様にほぼ100%の回収が得られた。

5. ラット組織中 Se 濃度

前記飼料にて2週間飼育後のラット各組織中 Se 濃度は表4に示す通りである。肝臓、腎臓では Se 濃度は高く、しかも摂取 Se 濃度に準じて濃度が変化するが、脳や睾丸の Se 濃度は必ずしも飼料中の Se 濃度に応じて変化しないことが明らかとなった。

結 論

1. 水素化物加熱原子化・原子吸光法による生体試料中微量 Se の定量の各種条件（水素化物発生、加熱原子化、反応液、標準曲線、試料灰化法、添加 Se の回収率、共存金属元素の影響等）について検討を加えた。その結果本法では生体試料中 Se 濃度 0.25 ppb まで検出可能であることが判明した。
2. 飼料中 Se 濃度を変化させた（0.02～1 $\mu\text{g/g}$ ）8 種類の飼料にて2週間飼育したラットの血液中及び各種臓器中 Se 量を本方法にて測定した。血液、肝臓、腎臓などの Se 量は比較的 Se 量に準じて変化するが、脳や睾丸の Se 量は投与 Se 量によって顕著な変化は認められなかった。

文 献

1. THOMSON, C. D. and M. F. ROBINSON (1980) Amer. J. Clin. Nutr. 33:303
2. VAN RIJ, A. M., C. D. THOMSON, J. M. MCKENZIE and M. F. ROBINSON (1979) Amer. J. Clin. Nutr. 32:2076
3. JOHNSON, R. A., S. S. BAKER and J. T. FALLON (1981) N. Engl. J. Med. 304:1210
4. SMITH, M. L., E. F. STOHLMAN and R. D. LILLIE (1937) J. Pharmacol. Exp. Therap. 60:449
5. 日本分析化学会編（1971）改訂二版 分析化学便覧 225
6. 中室克彦, 佐谷戸安好, 外村正治, 小瀬洋善（1972）衛生化学 18: 237
7. COX, D. E. and A. E. BIBB (1981) J. Assoc. off. Anal. Chem. 64:265