

高速液体クロマトグラフィーを利用する生体試料中のバナジウムとモリブデンの微量定量法について

山 田 秀 和・服 部 共 生

(京都府立大学 農学部農芸化学科*)

Determination of Vanadium and Molybdenum in Biological Samples by High-Performance Liquid Chromatography

Hidekazu YAMADA and Tomoo HATTORI

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kyoto Prefectural University*

The determinations of a trace amount of molybdenum, tungsten and vanadium by high-performance liquid chromatography are proposed.

The molybdenum and tungsten in the form of tiron (1, 2-dihydroxybenzene-3, 5-disulfonic acid) chelates were separated on a C₁₈-bonded phase column with methanol-water containing tetrabutylammonium bromide (TBA-Br) as a mobile phase, and were simultaneously determined at 315nm.

The vanadium in the form of PAR (4-(2-pyridylazo)-resorcinol) chelate was also separated in the same way as the determination of molybdenum and tungsten, and was spectrophotometrically determined at 555nm.

These techniques were applied successfully to the analysis of plant materials after wet ashing of the sample and extraction of the molybdenum and tungsten as α -benzoinoxime complexes or the vanadium as the *N*-benzoyl-*N*-phenylhydroxylamine complex.

* 所在地：京都市左京区下鴨半木町（〒606）

筆者等はモリブデン(Mo)、バナジウム(V)、クロム(Cr)、タングステン(W)、等の酸素酸イオンを形成する元素の土壌-植物系における分布や挙動について検討を進めている。本報ではその研究の一環として、生体-主に植物-試料中の微量のV, Mo, Wの定量法について検討を加えたのでその概要を報告する。なお、これら元素の定量法として、フレームレス原子吸光法や誘導結合プラズマ発光分光分析法の利用が検討されているが、本報では高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を利用する方法を検討した。

1. モリブデンとタングステンの同時定量¹⁾

MoはWと化学的性質がよく類似することから、生体内や土壌中での両元素の挙動の類似性や相互作用の存在等が予想される。そこで本研究では両元素の挙動を同時に評価・考察できるように両元素の同時定量法を検討した。

MoとWのHPLCを用いる分離定量法として、これら元素をキレート化してこれを分離し、吸光光度法で検出定量することとし、各種のキレート剤を比較検討した。その結果、タイロン(1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonic acid, 2Na salt)をキレート剤に、生成するキレートアニオンの対イオンとして臭化テトラブチルアンモニウム(Tetra-*n*-butylammoniumbromide: TBA-Br)を用い、C₁₈カラム上で両元素のキレートが分離定量できることを見出した。分析の諸条件を検討し、以下の条件で良好な結果の得られることが認められた。

装置：HPLCとして、日本分光製のTWINCLEに同社製の吸光光度検出器UV IDEC-100Ⅲと島津製クロマトパックC-R1Bを接続して使用した。カラムは半井化学製のCosmosil C₁₈(150×4.6mm, Particle size 5μm)を使用した。

溶離液：タイロンを 1.5×10^{-3} M, TBA-Brを 3×10^{-2} M, pH 3.8の酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液を 1.5×10^{-3} M含むメタノール-水混合液(体積比57:43)を使用した。流速は0.7 ml/minとした。

分析方法：10μg以下のMo, Wを含む中性溶液に 1.5×10^{-2} Mタイロン1 mlと0.2 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH 3.8)1 mlを加え純水で全量を10 mlとする。この溶液100 μlを供試し、溶離するMoとWのキレートを波長315 nmで検出(吸光度フルスケール(AUFS)を0.04または0.02)する。

図1に、クロマトグラムの一例を示す。W, Moの順に、それぞれ保持時間約8.3, 9.6 minの位置に各キレートが溶出する。pH 3.8でのキレートの組成を連続変化法によって検討したところ、両キレート共に1:1の組成であったことから、これらのピークは1:1型のキレートに由来するものと考えられる。ピーク高さ、または面積をとって求めた検量線は良好な直線

性を示し、例えば、ピーク高さを取り AUFS 0.01で、Moは $2 \times 10^{-7} \text{M} \sim 1 \times 10^{-5} \text{M}$ 、Wは $1 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-6} \text{M}$ の範囲でそれぞれ良好な直線の検量線が成立した。

Mo, Wをそれぞれ 1 ppm 含む溶液 10 点を供試して検討した分析精度は、変動係数で Mo 2.4%, W 1.7% であった。また SN 比 2, AUFS 0.01 の条件で求めた検出限界は Mo 1.6, W 2.2 ng であった。

なお Mo, W のタイロン呈色液は非常に安定で、室温条件で 1 か月放置してもクロマトグラムに変化は認められなかった。

定量に及ぼす共存イオンの影響について検討したところ、微量の Fe^{3+} , V^{5+} , Cr^{6+} , Ti^{4+} 及び Sn^{2+} による顕著な妨害が認められた。これらの妨害元素の内 Fe^{3+} 等は生体中に Mo に比べて多量に存在する。そこで本法を実試料に応用するために、試料分解液中から Mo, W を α -ベンゾインオキシム (α -benzoinoxime) で抽出分離する方法を検討した。その結果、以下の方法を確立した。

植物試料の分析：乾燥粉末試料 1 g を硫酸—過塩素酸—硝酸で分解する。分解液の適当量を分液ロートに移し、水層を硫酸、または過塩素酸の濃度が 2N 以下で全量を約 40 ml としたのち、 α -ベンゾインオキシムのクロロホルム溶液 10 ml で約 5 分間抽出する。分相後クロロホルム層を分取し、水層を再度 α -ベンゾインオキシム溶液 10 ml で抽出する。抽出した有機層を合わせ、そのうちの一定量を小型ビーカーにとり穏やかに加熱して蒸発乾固させる。次いでビーカーを電気炉に移し、約 550 °C で 20~30 分間灰化する。冷後、灰化物を 0.1 N-NaOH 1 ml で加熱溶解し、0.1 N- H_2SO_4 1 ml で中和し、上述のようにタイロンで発色させ HPLC に供試する。試料分解液のかわりに、Mo, W の標準液について同様に操作して得た検量線から試料中の Mo, W を定量する。

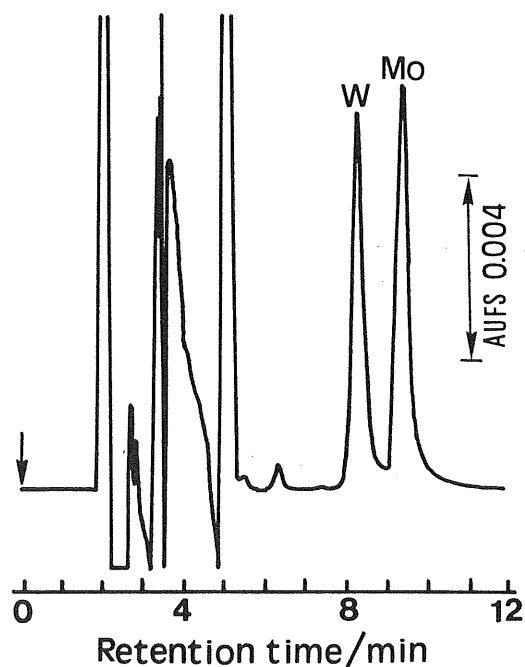


Fig. 1. Typical chromatogram column, Cosmosil C_{18} (150mm x 4.6mm I.D.); flow rate, 0.7 ml/min; detection wavelength, 315 nm; sensitivity, 0.04 AUFS; mobile phase, methanol-water (57:43, v/v) containing 0.0015M tiron, 0.03M TBA-Br and 0.0015M acetate buffer; sample, 100 μl containing 1 ppm each of molybdenum and tungsten.

植物試料へ応用した結果を表1に示す。Moの繰り返し精度はハウレンソウで4.3, クロレラで9.4%を示している。試料中のMo含量が比較的微量なことや、定量操作の比較的繁雑なことを考慮すると、本法の精度は良好なものといえる。分解前の試料に添加したMoの回収率はほぼ100%である。

一方、Wは殆ど検出されない。しかし、Wの添加回収率が約100%であることから考えると、これらの試料中のW含量は極めて微量なものと推定される。

以上のように本定量法によれば、従来法に比べて少量の試料でMo, Wを良好な精度で同時定量できる。

なお、 α -ベンゾインオキシムはMo, WとともにV, Crの一部も抽出するが、植物中のV, Crは通常少なくMo, Wの定量は殆ど妨害されない。しかし、多量が共存するような場合には、抽出時にV, Crを還元してマスキングすることができる。

2. バナジウムの定量²⁾

星野³⁾は Co^{3+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} - PAR (4-(2-pyridylazo)-resorcinol) キレートがTBA-Brを対イオンとして C_{18} カラム上で分離定量できることを報告している。PARは種々の金属イオンと反応し、VとはCyDTA (1, 2-cyclohexanediamine-N, N, N', N'-tetraacetic acid) 存在下でも反応して赤色のキレートを形成し、Vの高感度比色定量に利用されている。筆者等はPARを用いるVの比色定量法を星野等の方法に準じてHPLCに応用し、V分析のマイクロ化を検討した。

分析の各種の条件を検討し、以下の方法を確立した。なおこの方法は溶離液にCyDTAを含み、共存イオンの影響を受けにくかった。しかし Fe^{3+} による顕著な妨害が認められた。そこで生体分解液中のVをN-BPHA (N-benzoyl-N-phenylhydroxylamine) で分離したのち、HPLC分析に供試することにした。

植物試料中のバナジウムの定量：乾燥粉末試料0.5～1gを硫酸-過塩素酸-硝酸分解し、分解液(25ml)の一定量(20ml)を分液ロートに取り、0.1%硫酸セリウム溶液0.5mlを混合する。約15分放置後、濃塩酸10mlと0.1%N-BPHAのクロロホルム溶液10mlを加え、直ちに約1分間抽出する。分相後、有機層を分取し、水層を再度N-BPHA溶液8mlで抽出する。2回の抽出液を合わせ、その内の15mlを小型ビーカーに取り蒸発乾固したのち、550℃で約20～30分間灰化する。冷後、灰化物を0.1N-NaOH1mlで溶解、0.1N- H_2SO_4 1mlで中和したのち、0.1M (pH 5.5) リン酸(NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4)緩衝液1mlと 10^{-3} M-PAR1mlを加え純水で一定量とし、100 μ lを直ちにHPLC分析に供試する。ピークの検出は、波長

Table 1. Determination of molybdenum and tungsten in plant materials (Reproducibility and recovery of the analyses)

Sample taken (g)	Mo added (μg)	W added (μg)	Mo found (μg)	W found (μg)
Spinach	0.968	0	0.71	0.01
	0.968	0	0.75	0.03
	0.968	0	0.75	0.01 (X = 0.03)
	0.968	0	0.69	0.05
	0.968	0	0.77	0.03
X = 0.734 (0.76 ppm in original sample) S = 0.033 CV = 4.5%				
	0.968	1.0	1.83	1.04
	0.968	1.0	1.73	0.99
	0.968	1.0	1.83	X = 1.00
	0.968	1.0	1.73	Recovery = 97.3%
X = 1.78 Recovery = 105%				
NIES- chlorella	0.961	0	0.90	0.07
	0.961	0	0.72	0.05
	0.961	0	0.74	0.02 (X = 0.06)
	0.961	0	0.77	0.05
	0.961	0	0.74	0.09
X = 0.774 (0.81 ppm in original sample) S = 0.07 CV = 9.4%				
	0.961	1.0	1.86	1.04
	0.961	1.0	1.75	X = 1.03
	0.961	1.0	1.80	Recovery = 97.7%
X = 1.80 Recovery = 103%				

X, mean; S, standard deviation; C. V., coefficient of variation.
NIES, National Institute for Environmental Studies, Japan.

555nm, AUFS 0.02 または 0.04 で行う。

溶離液として, pH 5.5-リン酸緩衝液を 10^{-2} M, CyDTA を 10^{-3} M, TBA-Br を 0.25 % 含むメタノール-水混合液 (体積比: 60:40) を, 流速 0.7 ml/min で使用する。

HPLC装置及びカラムはMo, Wの場合と同様のものを使用した。

クロマトグラムの一例を図2に示す。検量線は, ピーク面積, 高さのいずれを取った場合も良好な直線性を示した。V 0.02 ppmの溶液6点を供試して求めた繰り返し精度は, 変動係数で 1.75 %で, AUFS 0.005, SN比2での検出限界は 17 pgであった。

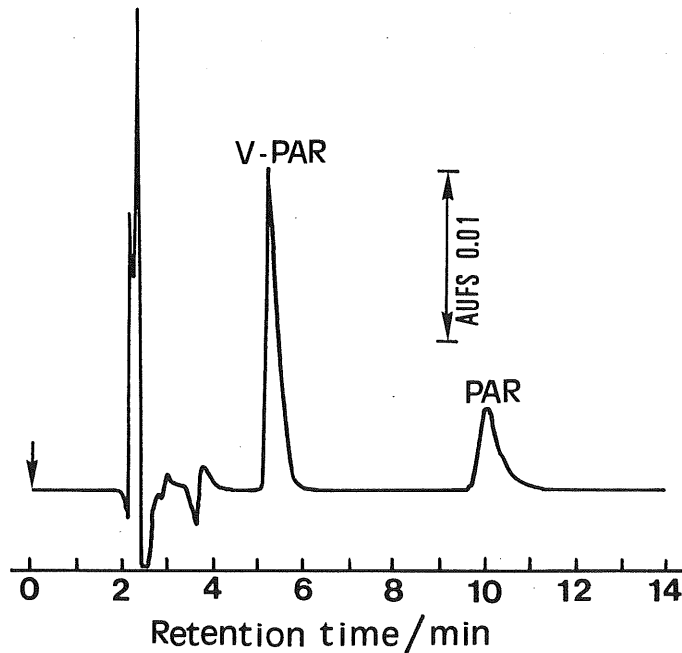


Fig. 2. Typical chromatogram column, Cosmosil C₁₈ (150mm x 4.6mm I.D.); flow rate, 0.7ml/min; detection wavelength, 555nm; sensitivity, 0.04 AUFS; mobile phase, methanol-water (60:40, v/v) containing 0.01M phosphate buffer (pH5.5), 0.001M CyDTA and 0.25% TBA-Br; sample, 100 μ l containing 0.02 ppm of vanadium.

植物試料の分析結果を表2に示す。繰り返し精度は 2.9 ~ 8.8 %, 添加回収率は 96.6 ~ 104 %を示す。また環境標準試料の分析結果は, 既に報告されている分析値等^{4), 5)} と比較的良く一致し, 本法の正確さが認められる。

Table 2. Determination of vanadium in plant materials (Reproducibility and recovery of the analyses)

Sample	Sample taken (g)	Vanadium added (μg)	Vanadium found (μg)	Vanadium content in original sample ($\mu\text{g/g}$)	Reported value ($\mu\text{g/g}$)
NIES-chlorella	0.480	0	0.20	X = 0.19 S = 0.0082 C.V. = 4.3%	0.51
	0.480	0	0.18		
	0.480	0	0.19		
	0.480	0	0.19		
	0.480	0.20	0.39	X = 0.398 Recovery = 104%	
	0.480	0.20	0.39		
	0.480	0.20	0.41		
	0.480	0.20	0.40		
NIES-pepperbush	0.458	0	0.26	X = 0.237 S = 0.021 C.V. = 8.8%	0.23-0.58 0.61
	0.458	0	0.23		
	0.458	0	0.22		
	0.458	0.20	0.43		
	0.458	0.20	0.44	X = 0.443 Recovery = 103%	
	0.458	0.20	0.46		
	0.458	0.20	0.44		
	0.458	0.20	0.44		

X, mean; S, standard deviation; C. V., coefficient of variation.

NIES, National Institute for Environmental Studies, Japan.

3. まとめ

生体（植物）試料中の Mo, W の同時定量法と V の定量法を提案した。Mo, W はタイロンキレートとして、V は PAR キレートとしていずれも TBA-Br を対イオンとして逆相分配イオン対クロマトグラフィーで分離定量できることが認められた。確立した方法は、共存イオンの影響を受けるため、生体分解液から目的成分を分離する繁雑さを伴うが、従来法に比べて少量の試料で正確で精度の高い分析が可能である。

文 献

1. YAMADA, H. and T. HATTORI (1985) J. of Chromatogr. 320:403
2. YAMADA, H. and T. HATTORI (1986) J. of Chromatogr. 361:331
3. 星野 仁, 四ッ柳隆夫, 青村和夫 (1978) 分化, 27: 315
4. 桐山哲也 (1984) 分化, 33: T38
5. OKAMOTO, K. (Editor) (1980), Research Report from the National Institute for Environmental Studies, Japan, No. 18