

報 文

プレカラムキレート化/オンラインカラム濃縮/
自動高速液体クロマトグラフィーによるウシ肝
臓中の ppm レベルの重金属の同時定量一ノ木 進^{®*}, 山 崎 満*, 大村美由紀*, 永井 里佳*Simultaneous determination of heavy metals at ppm level in Bovine Liver
by automated reversed-phase HPLC involving precolumn chelation
with hexamethylenedithiocarbamate and on-line column enrichment

Susumu ICHINOKI, Mitsuru YAMAZAKI, Miyuki OMURA and Rika NAGAI*

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University, Ho 3, Kanagawa-machi,
Kanazawa-shi Ishikawa, 920-11

(Received 5 February 1996, Accepted 8 April 1996)

Various procedures for reversed-phase HPLC determination of Cd, Ni, Pb, Zn, Cu, Hg, Co, and Bi as their hexamethylenedithiocarbamate (HMDC) chelates have been automated. The optimum analytical conditions were investigated for determination of the heavy metals in the standard reference material (Bovine Liver) of National Institute of Standards and Technology (NIST). A 100 mg sample was ashed with nitric and perchloric acid, and the residual acids evaporated. The resulting residue was then dissolved with diluted hydrochloric acid, and an aliquot of the solution was used for the HPLC analysis. The preparation of the standard solutions for calibration curves, chelation of metal ions, on-line enrichment of the HMDC chelates on a Capcell C₁₈ mini-column (10×4.0 mm i.d.), separation of the chelates on a Cosmosil 5C₁₈-MS analytical column (250×4.6 mm i.d.), and detection at 260 nm were all carried out with an optimum pre-treatment program and a time program. The analytical results of Zn and Cu (Zn: 124 ± 2, Cu: 156 ± 3 µg/g) were in good agreement with the certified values of NIST (Zn: 123 ± 8, Cu: 158 ± 7 µg/g), and the precision of the present method was also good (about 2%).

Keywords : automatic HPLC; determination of heavy metal; Bovine Liver; on-line column enrichment; hexamethylenedithiocarbamate.

1 緒 言

文明の発達とともに、人間の生活環境は大きく変わり

* 北陸大学薬学部薬品分析学教室: 920-11 石川県金沢市金川町ホ 3

つつある。水や土壌中の重金属濃度は、その毒性から人間の健康を守るために種々の法律（例えば水質汚濁防止法）によって規制されている。しかし、周知のとおり種々の金属元素は生物濃縮を繰り返し、人間の体内（特に臓器）には驚くべき高濃度で蓄積されることになる。

従って人間への蓄積の予測には、食物連鎖の頂点に近い
は乳類の臓器中の濃度を測定するのが最適と考えられ
る。

一方、近年の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の発展によって、複雑なマトリックス中の目的物を簡単に分離定量することが可能になってきた。金属イオンの定量に関しても、様々な分離モードと検出法を用いる分析法が数多く報告されており¹⁾²⁾、種々の植物や動物試料中の金属の定量にも適用されている^{3)~5)}。

種々の機器分析法の自動化の波は、LC にも押し寄せ、アミノ酸分析計に代表されるように、簡単な前処理しか必要としない試料の自動分析法は既に実用化されている。しかし、金属イオンの定量のために、キレート化操作や濃縮操作を行った後に分離定量する方法を自動化して、生体試料中の金属の分析を行った例は見当たらない。

著者らは、これまでに種々のキレート剤を用いて、金属イオンを無電荷キレートにした後、最も一般的な吸光検出器を備えた逆相 HPLC を用いた多元素同時定量法を開発してきた^{6)~9)}。最近の吸光検出器はかなり高感度ではあるが、試料中の微量重金属を定量するには、HPLC 分析の前になんらかの濃縮操作を必要とすることが多い。著者らは、キレート化と濃縮の手段として溶媒抽出法を利用してきたが、この方法の濃縮率を改善するために、ヘキサメチレンジチオカルバミン酸ヘキサメチレンアンモニウム (HMA-HMDC) をキレート試薬とする、オンラインカラム濃縮法を利用した分析法も開発した¹⁰⁾。この方法では、試料溶液 1~2 ml 中の ppb からサブ ppb レベルの Cd, Ni, Pb, Cu, Hg, Co 及び Bi の同時定量が可能であるが、キレート化や、金属キレートの濃縮と分析のための六方バルブの切り替え、検出器のゼロ点補正あるいはデータ処理装置のスタートなどの手動操作がかなり多くなっている。又、この方法で利用したカラム及び溶離液組成では Zn の定量はできなかった。

そこで本研究では、Zn も定量できる HPLC 条件を検討するとともに、これらの操作を自動化するために、①システムコントローラー、②オートインジェクター、③高圧六方バルブ、及び④検出器のゼロ点補正のためのリレーを従来の HPLC 装置に取り付け、種々の分析条件の最適化を図り、NIST の生体標準試料 Bovine Liver 中の Zn と Cu を定量した。

2 実 験

2.1 試 薬

試薬は特に断らない限り特級品を用いた。水は脱イオン水を更に Milli-Q システムで精製したものを用いた。メタノールとクロロホルムは、試薬一級品を蒸留後、孔径 0.45 μm のメンブランフィルターを通してから用いた。HMA-HMDC は、既報⁷⁾に従って合成した。0.01 M HMA-HMDC 水溶液は、1 週間ごとに新たに調製して冷蔵保存した。1 M クエン酸二アンモニウム溶液 (pH 9.0) は、既報¹⁰⁾に従って調製した。1 M $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 緩衝液 (pH 8.0) は、 NH_4Cl 1 モルを水約 800 ml に溶解した後、1 M NH_3 水を用いて pH を 8.0 とし、水で希釈して 1000 ml とした。この溶液中の重金属はジチゾンのクロロホルム溶液を用いて溶媒抽出法によって除去した。

NIST の生体標準試料 Bovine Liver (SRM 1577a) は、真空ポンプを用いて 24 時間減圧乾燥したものを使用した。

金属混合標準液は和光純薬製の原子吸光分析用 1000 ppm 溶液を用いて、以下の濃度に調製し、0.1 M 硝酸酸性溶液とした: Cd 48.0, Pb 16.0, Zn 14.0, Cu 16.0, Co 24.0 ng/ml。各金属濃度は NIST の保証値から計算して、この溶液 100 μl 中の金属量が Bovine Liver 10 mg 中の金属量にほぼ匹敵するように調製した。

溶離液は分析用溶離液 A と、濃縮用溶離液 B を調製し、溶離液瓶をアイスボックス中で氷冷しながらカラムに流した。

2.2 HPLC 装置

以下のユニットから構成された HPLC 装置を用いた。ポンプ A: Bio-Rad 1350T (分析用, 流量 1.2 ml/min), ポンプ B: Waters 6000A (濃縮用, 流量 1.0 ml/min), 分析用カラム: ナカライテスク Cosmosil 5 C₁₈-MS (250 $\times$ 4.6 mm i.d.), 濃縮用ミニカラム: 資生堂 Capcell C₁₈-AG-120 (10 $\times$ 4.0 mm i.d.), トラップカラム: Cosmosil 5 C₁₈ (150 $\times$ 4.0 mm i.d.), 恒温槽: 大洋科学工業 Thermominder Mini-80, 40 $\pm$ 1 $^\circ\text{C}$, 検出器: 日本分光 UVIDEK-100-VI (感度: 0.04 AUFS, 波長: 260 nm), データ処理装置: 島津 Chromatopac C-R4AD, システムコントローラー: 島津 SCL-10A, オートインジェクター: 島津 SIL-10A, 流路切り替え用高圧六方バルブ: 島津 FCV-12AH, サンプルクーラー: 島津 サンプルクーラー L。本 HPLC 装置の概略を Fig. 1 に示した。

3 本のカラムのうちトラップカラムは、Waters ポン

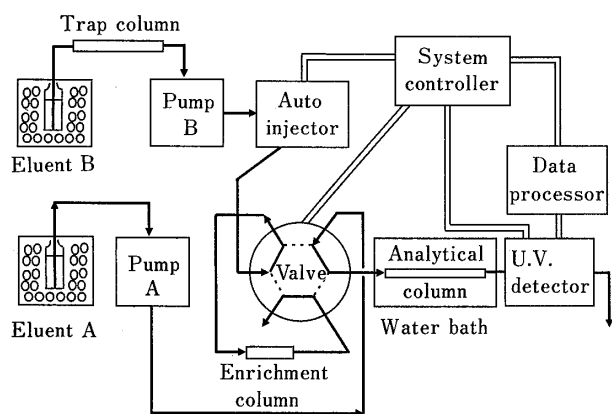


Fig. 1 Schematic diagram of automatic HPLC

管内で生成した金属キレートが、濃縮カラムへ流れて濃縮されるのを防ぐためのトラップと、ある程度の背圧を Waters ポンプにかける役目を果たし、カラム材質はポリエーテルエーテルケトン (PEEK), エンドジョイント中のフィルターはセラミックスである。その他は通常のステンレス鋼カラムを用いた。Bio-Rad ポンプはチタン仕様であり、溶離液中のキレート剤に対して安定な材質である。

2.3 分離カラムの選択と溶離液組成の検討

分離カラムとして Capcell C₁₈-AG-120 (5 μm) と Cosmosil 5 C₁₈-MS (5 μm) を充てんした内径 4.6 mm, 長さ 25 cm の 2 本のステンレス鋼カラムを用いて、カラム温度は 40°C に保って、CH₃OH-H₂O-CHCl₃ 混合液に 1 M NH₃-NH₄Cl 緩衝液 (pH 8.0) と 0.01 M HMA-HMDC 溶液を添加して、種々の組成で分離を行い、最適条件を調べた。

2.4 濃縮カラムの流路の検討

オートインジェクターで 2 ml の PEEK ループに注入された HPLC 用試料は、ポンプ B からの溶離液 B の流れによって、濃縮カラムに送られて、金属キレートはここで保持される。次に、高圧六方バルブの切り替えによって、溶離液 A が濃縮カラム内に入り、保持されたキレートを溶出させながら分析カラムに流れる。このときの溶離液 A と B の流れの方向は、六方バルブの配管方法によって、同じ方向にも逆方向にもできる。どちらの方法が有利であるかを調べるために、金属混合標準液 100 μl を水で 2 ml に希釈してキレート化操作を行った後、その 2000 μl を注入し、それぞれの配管方法で濃縮及び分離を行い、ピークの分離度と形状を比較した。

2.5 自動キレート化操作の検討

手動操作では、例えばキレート剤を加えた液を激しくかき混ぜることも可能であるが、オートインジェクターではできない。このような制約の中で、定量的な自動キレート化を行うための試薬の添加方法、かき混ぜる方法、反応温度及び反応時間について検討を行い、検討結果から最適な自動前処理プログラムを作成した。

2.6 分析プログラムの作成

2.6.1 タイムプログラム 自動 HPLC 分析を行うために、濃縮と分析のための六方バルブの切り替え操作、分析前の検出器の吸光度のゼロ点補正、データ処理装置のスタート、及び次の試料の前処理操作の開始を適切なタイミングで行うためのプログラムを作成した。

2.6.2 分析順序 HPLC 用試料の分析順序、その試料ごとの分析回数、注入量、タイムプログラム、及び前処理プログラムからなる分析プログラムを、検量線の作成 (標準液系列の測定) の後に試料の分析をするように作成した。

2.7 試料負荷限界量の測定

本法では、あらかじめキレート化操作をした溶液をミニカラムに注入し、金属キレートをオンライン濃縮した後、分離定量を行う。従って、試料溶液中の金属キレートの濃度が低くても、注入量が 1 ml を超えると、このカラムへの金属キレートの負荷量は相当多くなり、負荷限界を超えることが考えられた。そこで、種々の濃度範囲及び注入量で検量線を作成し、その直線範囲を調べることによって負荷限界を判断した。又、HPLC 用試料溶液へのメタノールの添加が、この負荷限界量に与える影響についても実験した。

2.8 推奨する Bovine Liver の灰化操作

乾燥試料の約 100 mg を精ひょうし、硬質ガラス製コニカルビーカー (50 ml) に採る。空試験用にも同様のコニカルビーカーを用意し、硝酸-過塩素酸混液 (1:1) 5 ml を各々のビーカーに加えて時計皿でふたをして一夜放置する。翌日、このコニカルビーカーをドラフトチャンバー内のホットプレートに載せ、ビーカーの周囲をアルミホイルで囲んで熱効率をよくして、徐々に温度を上げながら穏やかに灰化する (50°C 20 分→75°C 20 分→100°C 20 分→125°C 40 分)。この時点ではほぼ透明な液が得られるので、ここでコニカルビーカーをホットプレートから下ろして放冷する。冷後、過塩素酸 5 ml をビーカーの内壁の周りをまんべんなく伝わらせながら加

えて、再び同じ時計皿でふたをして 150°C で 20 分間加熱し、更に 200°C で 60 分間加熱した後、ホットプレートから下ろして放冷する。冷後、時計皿の内側についた液をビーカー内に水で流し込んだ後、酸とともに 125°C で一夜蒸発乾固させる。

2・9 Bovine Liver 中の Zn と Cu の同時定量

上記の灰化法に従って得られた試料及び空試験ビーカーに、5 ml の 0.1 M 塩酸を加え、ホットプレート上で 100°C で 1 分間加熱溶解して灰分を溶解した。この液 250 μ l を試料瓶に分け入れ、水 1250 μ l とメタノール 500 μ l を加えて全量を 2000 μ l としたものを 8 本調製し、オートインジェクターにセットした。標準液用には、空試験液 250 μ l とメタノール 500 μ l を入れた 6 本の試料瓶をセットし、標準液の添加と希釈は前処理プログラムで行って全量を 2000 μ l とした。これらの溶液中の金属イオンのキレート化と HPLC 分析も、作成したプログラムを用いて行い、試料中の Zn と Cu の分析を行った。その結果を NIST の保証値と比較して本法の正確さを、又繰り返し実験から定量値の相対標準偏差 (RSD%) を求めて再現精度を評価した。

3 結果と考察

3・1 溶離液組成

Cd, Ni, Pb, Zn, Cu, Hg, Co 及び Bi の HMDC キレートの中では、Zn キレートが最もカラム内で解離しやすく、Zn キレートを安定に溶出させるにはかなり高濃度の HMA-HMDC が溶離液中に必要である¹¹⁾。そこで安定したベースラインを得るために、溶離液を弱アルカリ性としてキレートの安定化を図り、HMA-HMDC 濃度をできる限り低くすることを試みた。

混合金属標準液 (1.0~2.0 μ g/ml) 200 μ l を水で希釈して 2000 μ l とした溶液を用いて、キレート化の後に濃縮及び分離を行った。各キレートの分離度は、溶離液 100 ml に対して、0.01 M HMA-HMDC 1 ml (溶離液中での濃度 100 μ M), 1 M $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 緩衝液 3 ml とし、妥当な溶出時間になるように、まず水とメタノールの割合を調節し、次に CHCl_3 含量を 0% から 10% まで 2% 刻みで変化させて、最も分離の良い条件を求めた。次に、Cosmosil 5 C_{18} -MS 及び Capcell C_{18} カラムを用いて、溶離液中の HMA-HMDC 濃度を変化させて実験した。その結果、20 μ M の HMA-HMDC 濃度的时候、前者のカラムでは 8 金属キレートがベースライン分離できたが {Fig. 2(b)}、後者のカラムでは Zn キレートピークはテイリングが大きく、又ピーク面積が前

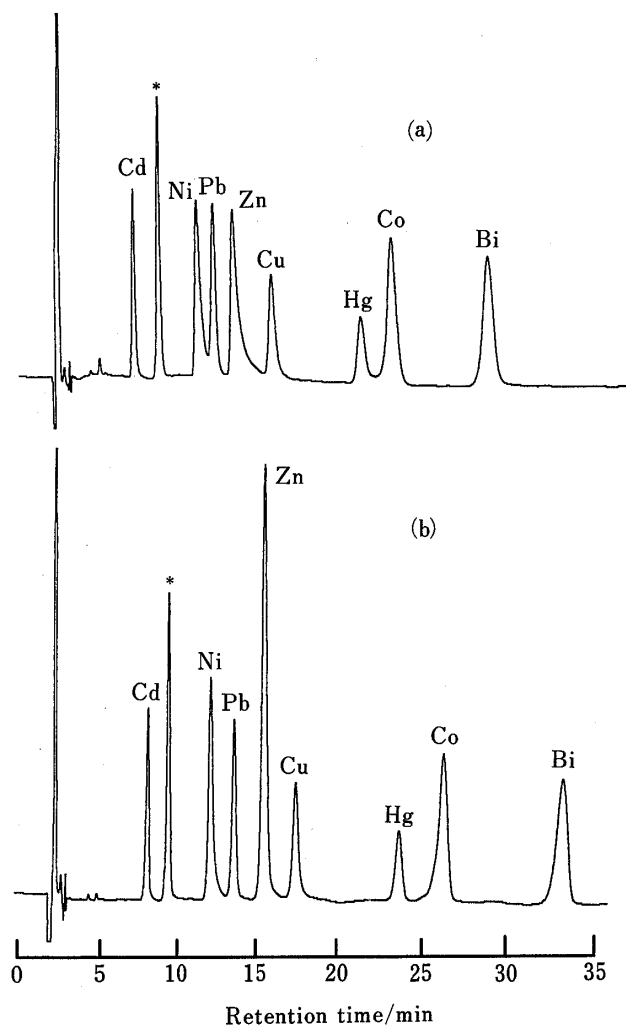


Fig. 2 Separation of metal HMDC chelates on (a) Capcell C_{18} (AG-120) and (b) Cosmosil 5 C_{18} -MS columns

Column size: 250 $\times$ 4.6 mm i.d.; Column temp.: 40°C; Eluent: $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O-CHCl}_3$ -1 M $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ (pH 8.0)-0.01 M HMA-HMDC (74 : 18 : 5 : 3 : 0.2); Flow rate: 1.2 ml/min; Detector range: 0.04 AUFS at 260 nm; Attenuation of data processor: 7 (0.04 AU=2⁷ mV)

*: This peak is probably disulfide.

者の場合のおよそ 30% となったことから、カラム中での Zn キレートの解離が示唆された {Fig. 2(a)}。以上の検討結果から、カラムは Cosmosil 5 C_{18} -MS、溶離液は $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O-CHCl}_3$ -1 M $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ (pH 8.0)-0.01 M HMA-HMDC (74 : 18 : 5 : 3 : 0.5) のものを選んだ (HMA-HMDC 濃度 50 μ M)。溶離液 B については、既報の手動カラム濃縮法¹⁰⁾に準じて $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$ -1 M $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ (pH 8.0)-0.01 M HMA-HMDC (20 : 77 : 3 : 0.5) のものを調製した。0.01 M HMA-HMDC 濃度

は, 今回の溶離液 A 中の濃度と等しくした. 本 HPLC 条件で, 試料注入量を 2000 μ l にすると, HPLC 用試料溶液中で 5~10 ng/ml の Cd, Ni, Pb, Zn, Cu, Hg, Co 及び Bi が検出できた.

Bovine Liver を灰化して, 手動法で HPLC 分析の予試験を行った結果, Zn と Cu 以外は上記の濃度よりも低濃度であったため検出できなかった. そこでこれ以降は Zn と Cu の定量のための検討を行った.

3.2 濃縮カラム流路の検討

カラム濃縮時と分析時の濃縮カラム内の溶離液の流れの方向を, 既報¹⁰⁾と同様に逆方向にした場合, キレート負荷量が少ないときには問題がなかったが, 多くなったときに (金属としておおよそ 1 μ g), Cu キレートのピークだけがテイリングした. 同じ負荷量でも, 流れの方向を同じにしたときには, Zn 及び Cu キレート共にシャープでテイリングのないピークであったので, 以後は同じ方向になる配管方法で実験した (Fig. 1).

3.3 自動キレート化操作

キレート剤 HMA-HMDC は熱に不安定で温度が高いほどジスルフィドを生成しやすくなる¹²⁾. そこで 0.01 M の水溶液は冷蔵庫に保存した. しかし, キレート化操作 (前処理) の自動化のためには, オートインジェクター内の試料ラックにその溶液を放置しなくてはならない. 添加量は既報¹⁰⁾を参考にして, 試料溶液 2 ml に対して 1 M クエン酸二アンモニウム溶液 (pH 9.0) 400 μ l と 0.01 M HMA-HMDC 100 μ l を加えることにした. 但し, HMA-HMDC はアルカリ性のほうがより安定であるので, これらの溶液をあらかじめ 4:1 に混合した液を, オートインジェクターの試薬瓶に入れ, その 500 μ l を分取して試料瓶に添加した. その結果は, 後述するように HMA-HMDC を室温で放置しても問題ないことが分かった.

次にかき混ぜのために, オートインジェクターの混合のためのコマンド "MIX" を使って実験してみたが, この操作は繰り返すたびに, キレートのピーク面積が小さくなることが分かった. そこで, 試料溶液に空気を注入して, 試料瓶の底から発生する空気の泡によってかき混ぜることでこの問題を解決した.

又, 反応温度の若干の検討として, 試料ラックの温度を室温 (約 23°C) と 5°C にして, 自動キレート化操作を行い, 得られた溶液の 1000 μ l を注入して, Zn 0~700, Cu 0~800 ng/ml の検量線を作成した (このときの反応時間は約 90 分). その結果, 検量線を直線回

帰したときの傾きと相関係数はほぼ同じであったが, ピーク形状は室温のほうがシャープで, テイリングもなかったもので, 反応温度は室温とした.

又, 前処理操作終了から注入までの時間がキレート生成に及ぼす影響を, 0, 38, 76, 114 分について検討した. その結果, ピーク面積は実験誤差内でほぼ同じであったが, ピーク形状ではキレート化とかき混ぜ操作の直後に注入したときのピークが, わずかながら最もシャープであった. ピーク面積の再現性を RSD% で表すと, 0 分 2.2%, 38 分 3.3%, 76 分 2.8%, 114 分 4.7% であり, 0 分が最も優れていたもので, 前処理終了後直ちに注入することにした.

検量線作成のための標準液系列も, 作成した前処理プログラムを用いて調製した. はじめに, 必要な量の水を試料瓶に入れ, 次に標準液の必要量を加えてかき混ぜた. 標準液は, 空気で挟まれていったんテフロンループ内に吸われ, 次にこれが試料瓶に加えられる. この液を挟む空気の量が多すぎると正確な分取ができなかったが, 両側の空気量が 20 μ l のときの Zn と Cu の検量線の相関係数は 0.999 以上であった.

以上の検討結果をもとに標準液及び試料の前処理プログラムを作成した. 検量線の作成のための前処理プログラムの一例を Table 1 に示した.

3.4 タイムプログラム

試料注入の前に, 濃縮カラム内の溶離液の流れを溶離液 A から B に切り替えて, キレートが保持されやすい移動相にし, 試料注入後更に数分間そのまま溶離液 B を流して, 過剰のクエン酸二アンモニウムとキレート剤 HMA-HMDC を排出した後に, 溶離液を A に切り替えて分析カラムに導いた. このタイミングは, 既報¹⁰⁾を参考にして, 注入の 3 分前に溶離液 B を流し, 注入から 5 分後に溶離液 A に切り替えた.

紫外検出器のゼロ点補正は, リレーを用いて分析の 0.1 分前に行い, データ処理装置の分析開始は, "start" 命令で行う. タイムプログラムの一例を Table 2 に示した.

次に, プログラムの終了時間から次の試料の前処理に必要な時間を引き算して, 次の試料の前処理の開始命令を出す. データ処理装置のタイムプログラムによって, 分析が終了するところに, カラム流路を切り替えて次の注入の準備に入る. 最後にこのプログラムのストップ命令で一連のプログラムが終了する. この時点で次の試料が注入されることになる.

Table 1 Time table for preparation of calibration curve

(a) Pretreatment program		(b) Standard injection program	
Time/ min	Procedure	Time/ min	Procedure
0.0	rinse of syringe and Teflon tube*	0.0	rinse of syringe and Teflon tube
1.2	addition of water into the vial for standard solution series	1.2	rinse of injection port
2.3	rinse of syringe and Teflon tube	2.2	loading of sample solution (500 μ l) on Teflon tube
3.6	addition of metal standard solution	2.4	valve switching for loading
5.4	rinse of syringe and Teflon tube	2.4	injection of sample into PEEK sample loop
6.7	mixing	2.6	valve switching for injection
8.4	rinse of syringe and Teflon tube	2.6	rinse of injection port
9.5	addition of mixed solution of 1.0 M ammonium citrate and 0.01 M HMA-HMDC	3.9	rinse of syringe and Teflon tube
11.5	rinse of syringe and Teflon tube	5.2	loading of methanol (1000 μ l) on Teflon tube
12.8	mixing (3 times)	6.2	discharge of methanol via injection port to waste
20.1	rinse of syringe and Teflon tube	6.8	rinse of syringe and Teflon tube
21.5	go to standard injection program		

* Rinse was carried out with Milli-Q water.

Table 2 Typical time program

Time Program File #2	#	time	func.	Value	Action
0	4.90	event	1		adjustment of detector
1	5.00	rv. a	1		valve switching
2	5.00	start			start of data processor
3	21.40	s. pret			start of pretreatment
4	34.00	rv. a	0		valve switching
5	37.00	stop			end of this time program

3・5 分析順序

分析順序は、まず HPLC 流路の洗浄のために、0.01 M HMA-HMDC を 1 ml 注入し、次に水を 1 ml 注入してから、検量線の作成を行い、最後に試料の分析を行うようにした。検量線の作成と試料の分析のためのタイムプログラムと前処理プログラムは、別々のものを用いた。

3・6 試料負荷限界量と注入量

前述の前処理プログラムを用いて、Zn 0~1.4, Cu 0~1.6 μ g/ml の溶液 2000 μ l に、1 M クエン酸二アンモニウムと 0.01 M HMA-HMDC 混液 (4:1) 500 μ l を添加した後、その 2000 μ l を注入して検量線を作成した。その結果、ピーク高さ対金属濃度の検量線は、中間濃度付近から右に曲がり始めた。

Bovine Liver 中には Zn と Cu がかなり高濃度に含ま

れているが、あまり少量の試料を分析に用いると、試料の不均一さによって定量値がばらつくおそれがあるので、100 mg 程度を採取する必要があると考えた。この採取量と保証値の Zn と Cu の量から計算すると、注入量 2000 μ l では高さ検量線が曲がり始める濃度に相当することが分かった。この曲がり始める点を定量分析のための試料負荷限界と判断した。この限界量を金属の絶対量で表すと、Zn, Cu 共に約 0.8 μ g に相当する。試料注入量 500 μ l では、金属濃度に対してピーク高さピーク面積どちらでも、検量線の直線性もピーク形状も良好であったので、注入量は 500 μ l とした。

又、HPLC 用試料溶液はこれまで水溶液としてきたが、濃縮用溶離液と似た組成ではどうなるかを調べるために、標準液系列にメタノールを 500 μ l 添加して検量線を作成したところ、ピークがシャープになることが分かったので、HPLC 用試料中に 20% になるようにメタノールを添加することにした。注入量 500 μ l における濃縮カラムへの金属負荷量約 0.2 μ g でのシャープさを、理論段数 $[N=5.54 \times (\text{保持時間}/\text{半値幅})^2]$ で表すと、メタノールを添加しないときの Zn と Cu キレートピークの理論段数はそれぞれ 11600 及び 7400 段、添加したときはそれぞれ 14200 及び 13600 段であった。この高濃度のキレートを濃縮する実験中に、オートインジェクターのテフロン製試料ループにキレートが吸着されているのが発見された。これがすぐに定量結果を大きく左右することはなかったが、汚染防止のために試料の注入後

Table 3 Analytical results of zinc and copper in Bovine Liver by automated HPLC

No. of run	Zinc/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Copper/ $\mu\text{g g}^{-1}$
1	122.9	152.4
2	121.9	157.6
3	124.3	155.4
4	127.4	161.9
5	121.6	151.9
6	125.4	159.2
7	124.2	155.1
8	120.2	155.4
Mean $\pm$ S.D.	123.5 $\pm$ 2.3	156.1 $\pm$ 3.3
RSD%	1.9%	2.1%
Certified values	123 $\pm$ 8	158 $\pm$ 7
Calibration curve	$y = 11.343x + 37.35$	$y = 7.280x - 7.12$
Correlation coefficient	0.9998	0.9998

y : peak area (mVs), x : metal concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)

に, テフロンループをメタノールで洗浄する操作を標準注入プログラムに追加した (Table 1, b).

3.7 Bovine Liver 中の Zn と Cu の同時定量

自動 HPLC によって作成された Zn と Cu の検量線は, HPLC 用試料溶液 (2500 μl) 中の Zn 濃度 0~560 ng/ml, Cu 濃度 0~640 ng/ml の範囲で, 相関係数 0.999 以上のほぼ原点を通る良好な直線となった. 8 回の繰り返し分析の結果を Table 3 に, 得られたクロマトグラムを Fig. 3 に示した. Table 3 から明らかなように Zn と Cu の定量結果は, 保証値とよく一致し, 相対標準偏差も Zn 1.9%, Cu 2.1% と良好であった. 後日, 新たに Bovine Liver 試料を灰化して, 同様の実験を行った結果, Zn 123.2 $\pm$ 2.8, Cu 156.6 $\pm$ 1.8 $\mu\text{g/g}$ (共に $n=8$) と, 日間の精度及び正確さも良好であった.

本法での Cd, Ni, Pb, Zn, Cu, Hg, Co 及び Bi の定量下限は, 試料 100 mg を灰化して 5 ml の希塩酸に灰分を溶解してその 250 μl を用いて HPLC 用試料溶液を調製し, 注入量 500 μl で分析すると, 試料中の濃度としておよそ 1 $\mu\text{g/g}$ である. 従って, 試料の量や注入量を多くすれば, 更に低濃度の分析も可能であろう.

(1993 年 6 月, 第 54 回分析化学討論会において一部発表)

文 献

- 1) G. Nickless: *J. Chromatogr.*, **313**, 129 (1985).
- 2) A. R. Timerbaev, O.M. Petrukhin, Yu. A. Zolo-

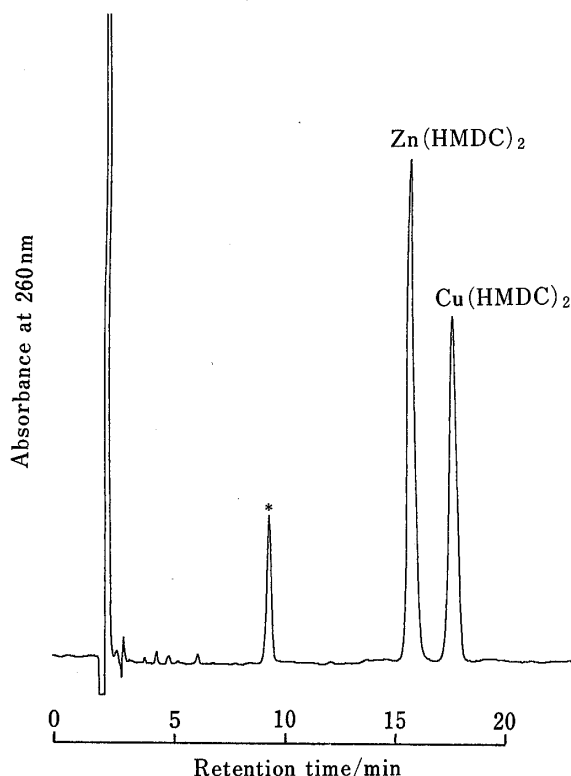


Fig. 3 Analytical chromatogram of zinc and copper in Bovine Liver

HPLC conditions are the same as in Fig. 2

*: This peak is probably disulfide

- 3) S. B. Adeloju: *Anal. Chim. Acta*, **164**, 181 (1984).
- 4) K. Saitoh, N. Suzuki: *Anal. Chim. Acta*, **178**, 169 (1985).
- 5) A. M. Bond, Y. Nagaosa: *Anal. Chim. Acta*, **178**, 197 (1985).
- 6) S. Ichinoki, M. Yamazaki: *Bunseki Kagaku*, **31**, E319 (1982).
- 7) S. Ichinoki, T. Morita, M. Yamazaki: *J. Liq. Chromatogr.*, **6**, 2079 (1983).
- 8) S. Ichinoki, N. Hongo, M. Yamazaki: *Anal. Chem.*, **60**, 2099 (1988).
- 9) S. Ichinoki, M. Yamazaki: *J. Chromatogr. Sci.*, **28**, 258 (1990).
- 10) S. Ichinoki, M. Yamazaki: *J. Chromatogr. Sci.*, **29**, 184 (1991).
- 11) S. Ichinoki, M. Yamazaki: *Anal. Chem.*, **57**, 2219 (1985).
- 12) G. D. Thorn, R. A. Ludwig: "The Dithiocarbamates and Related Compounds", p. 61 (1962), (Elsevier Pub., Amsterdam).

要 旨

Cd, Ni, Pb, Zn, Cu, Hg, Co 及び Bi イオンをヘキサメチレンジチオカルバミン酸キレートとして、オンラインでミニカラム (C_{18}) に濃縮した後に分析カラムで分離し、紫外検出する方法を自動化するための種々の実験条件を検討し、最適分析条件を確立した。本法を米国 NIST の生体標準試料 Bovine Liver に適用した。乾燥した試料の 100 mg を、硝酸と過塩素酸を用いて湿式灰化し、使用した酸を蒸発乾固した後、残留物を希塩酸に溶解し、その一定量を HPLC 分析に用いた。最適化した自動 HPLC 法によって、標準液系列を調製しながら検量線を作成し、次に試料溶液を測定した。その結果 Bovine Liver 中の Zn と Cu が検出されたが、ほかの Cd, Ni などは検出できなかった。本法による定量結果は、Zn 124 ± 2 , Cu 156 ± 3 $\mu\text{g/g}$ と NIST の保証値 (Zn 123 ± 8 , Cu 158 ± 7 $\mu\text{g/g}$) とよく一致し、繰り返し再現精度 ($n=8$) も約 2% と良好であった。