

母乳中の微量モリブデンの迅速簡易測定法

後反 克典*, 土田 絵理子, 小泉 貞之

福井工業高等専門学校 物質工学科 (〒916-8507 福井県鯖江市下司町)

*gotan@fukui-nct.ac.jp

Rapid measurement of trace amounts of molybdenum in mother's milk

Katsunori GOTAN*, Eriko TSUCHIDA, Sadayuki KOIZUMI

Department of Chemistry and Biology, National Institute of Technology, Fukui College

(Geshi-cho, Sabae-shi, Fukui 916-8507, Japan)

(Received June 22, 2017; Accepted July 24, 2017)

Abstract

In recent years, molybdenum, which is involved in redox reactions, such as enzyme reactions, has attracted attention as an essential trace element in vivo. For babies taking nourishment from mother's milk, it becomes possible to evaluate the nourishment state and disease prevention by estimating the amount of minerals in the milk. However, the normal level of molybdenum in mother's milk has not been clarified. The purpose of this study was to establish a rapid and simple method for determining the trace amount of molybdenum in mother's milk by graphite furnace atomic absorption spectrometry. In conclusion, by oxidatively decomposing milk samples in a graphite furnace using $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$, it is possible to measure the concentration of molybdenum in milk samples directly.

Keywords: mother's milk, breast milk, skim milk, molybdenum, trace element, AAS

1 諸言

生物が正常な生命活動を続けていく上で、主要ミネラル成分以外にも微量元素として Cr、Co、Se、Mo 等が必要不可欠である[1]。必須元素の過不足は生物に対して悪影響を及ぼし、不足すれば欠乏症、多すぎれば過剰症となり様々な疾患を引き起こす原因となる。近年注目を集めてい

る元素の一つにモリブデンが挙げられる。モリブデンは生体内において酸化還元反応を触媒するキサンチンオキシターゼやニトログナーゼ等の金属酵素に含まれており、その活性はモリブデンに依存することから生体内におけるモリブデンの必要性が明らかとなった[2]。

乳児の摂取する栄養は、疾患治療などの特殊な場合を

除けば、母乳あるいは人工乳に限られる。従って、乳中のミネラル含有量を知ることにより乳児のミネラル摂取量が算出でき、これにより病気の予防や栄養状態の把握などが可能になる。しかし、母乳中のモリブデン濃度の分析例は少なく、モリブデン濃度の正常値は明らかにされていない。その要因の一つとして、乳試料は脂肪分が多いために前処理が煩雑であり、微量成分であるモリブデンの測定を困難にしていると考えられる。従って、本研究ではフレームレス原子吸光法による乳試料中の微量モリブデン含有量の迅速・簡便な直接定量法についての検討を行った。

2 実験

2.1 試薬・試料

モリブデン標準溶液には、ナカライテスク製の 1000 mg/L 原子吸光分析用標準溶液を用いた。希釈には、日本ミリポア製 Milli-Q SP. TOC で精製を行った超純水を用いた。乳標準試料には、NIST の全粉乳標準試料 (NIST SRM 8435) を用いた。また、実試料としての母乳試料は福井県内在住の 20 代女性 (1 名) から提供いただいたものを使用した。

2.2 装置

モリブデンの測定には Perkin Elmer 製黒鉛炉原子吸光装置 4100ZL に同社製のパイロコーティング処理されたプラットフォーム型黒鉛炉を装着したものを用いた。アルゴンガスを雰囲気ガスとして、ゼーマン効果によるバックグラウンド補正を行った。原子吸光の測定条件を表 1 に示す。

表 1 モリブデンの測定条件

測定波長	313.3 nm
スリット幅	0.7 nm
ランプ電流	18 mA
ピーク測定法	ピーク面積
バックグラウンド補正	Zeeman-effect
試料体積	20 μ L

2.3 実験操作

測定試料は、標準粉乳 (SRM 8435) の濃度が 0.14 g/L になるように調製した。測定に際して、原子吸光装置のオ

ートサンプラーを用いて乳溶液を導入すると、試料溶液と酸がピペット内で接触し、タンパク質の変性によりピペット内で固化するため、マイクロピペットを用いて乳試料 20 μ L を手で黒鉛炉に直接導入した。その後、酸化処理剤として、0.1 mol/L HNO₃ と 7% H₂O₂ をオートサンプラーにより注入した。アルゴンガス雰囲気下中で乾燥、灰化、原子化を順に行った。試料を完全に乾燥させるため、110°C と 130°C の二段階で乾燥を行った。原子化後はメモリー効果を防ぐため 2600°C で 3 秒間クリーンアップを行った。本測定における原子化温度プログラムを表 2 に示す。

表 2 モリブデン測定における原子化温度プログラム

ステップ	温度 (°C)	温度勾配 (s)	保持時間 (s)	Arガス流量 (mL/min)
乾燥1	110	1	25	250
乾燥2	130	5	40	250
低温灰化	500	10	60	250
高温灰化	2000	10	20	250
原子化	2500	0	5	0
クリーンアップ	2500	1	2	250

3 結果および考察

3.1 酸化処理剤による処理回数の検討

乳試料に含まれる脂肪成分はモリブデンの原子吸光測定の際に最も妨害し、測定の繰り返しにより脂肪成分が炭化物となり黒鉛炉の消耗を早めることになる。これを改善するために酸化処理剤を用い、黒鉛炉内で乳試料を酸化処理することとした。ホットプレート上で乳試料を約 130°C に加熱し、炭化物の生成を抑えるため酸化処理剤として、HNO₃ + H₂O₂ を加えて実験を行った。酸化処理において爆発等の危険性を回避するためそれぞれ溶液を薄め、酸化処理剤の濃度および混合比は、0.1 mol/L HNO₃ 20 μ L + 7% H₂O₂ 15 μ L として処理を行った。この酸化処理剤による処理回数を 0、1、5、10 回と変化させ、黒鉛炉内の炭化物の生成量およびモリブデン吸光度への影響を検討した。処理回数と吸光度との関係を図 1 に示す。処理回数が少ない場合、黒鉛炉内の炭化物の量が非常に多く、モリブデン測定の妨害となった。処理操作を 5 回繰り返すことで黒鉛炉内の炭化物の量が減少し、測定の妨害が低減した。従って、本研究では乳試料の酸化処理回数を 5 回とした。

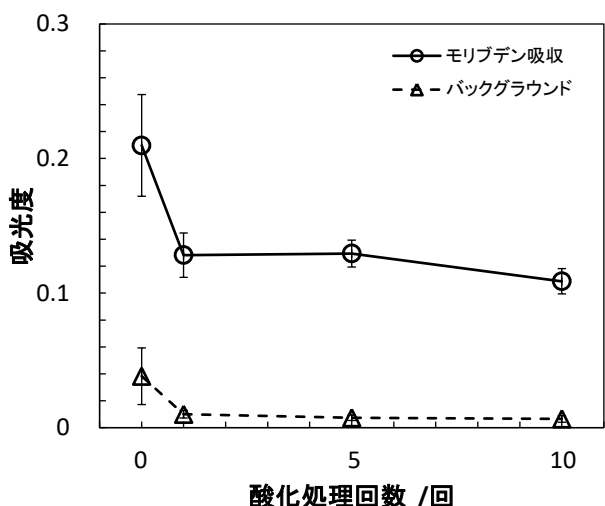


図1 乳試料中のモリブデン濃度測定における酸化処理回数の影響 (各点の測定回数 n = 5)

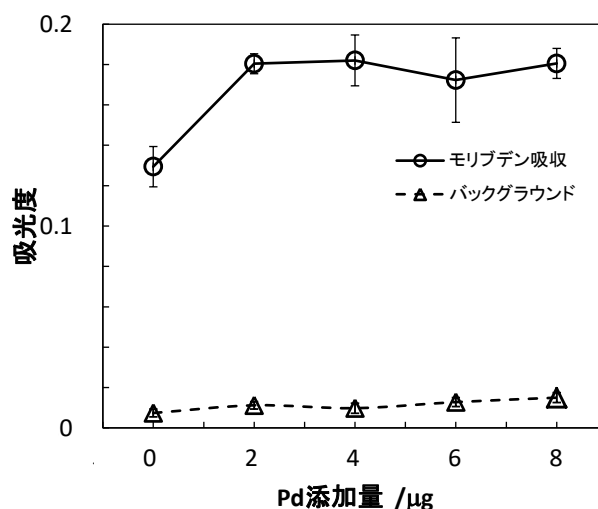


図2 乳試料中のモリブデン濃度測定におけるPd添加量の影響 (各点の測定回数 n = 4)

3.2 マトリックス修飾剤の添加量の検討

マトリックス修飾剤を添加することで、不揮発性でかつ原子化しやすいモリブデン複合化合物を形成する。各種マトリックス修飾剤が知られているが、灰化温度の上昇のため本研究ではPdを用いた[3]。マトリックス修飾剤の添加ではバックグラウンド吸収が生じるため、修飾剤 (1000 μg/L Pd(NO₃)₂) の添加量を2~8 μgの範囲で変化させて黒鉛炉に乳試料 10 μL と同時に注入し、モリブデン吸光度への影響を検討した。結果を図2に示す。モリブデン吸光度はPd添加量2~4 μgで上昇し、かつ低バックグラウンド値を示した。従って、Pd添加の最適量は2~4 μgであり、以降の実験では効果が得られる最小量の2 μgで行った。

3.3 灰化条件の検討

本測定において、低温と高温の二段階で灰化を行った。低温灰化は500℃で行い、有機物および揮発性物質を熱分解除去した。高温灰化ではモリブデンの損失が少なく、残留共存物質を熱分解できる温度を適用する必要がある。そこで、乳試料 20 μL とマトリックス修飾剤を黒鉛炉内に注入し、灰化温度を1500~2200℃の範囲で変化させてモリブデン吸光度への影響を検討した。図3より、灰化温度2000℃でモリブデン吸光度は安定し、2100℃以上ではモリブデン吸光度は減少したため、灰化温度を2000℃とした。

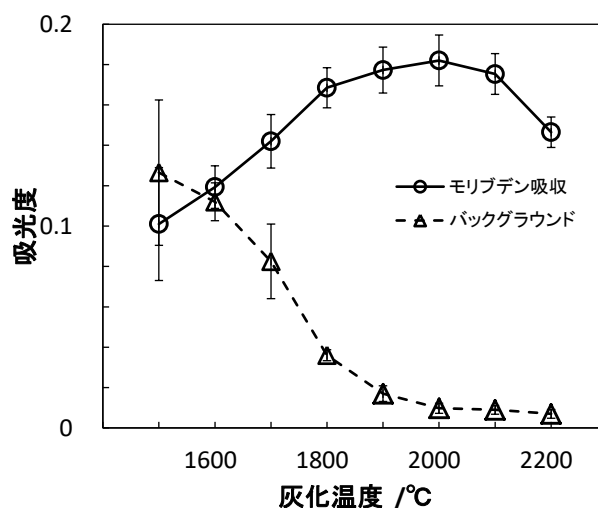


図3 乳試料中のモリブデン濃度測定における灰化温度の影響 (各点の測定回数 n = 4)

3.4 前処理した乳試料との比較

試料 10 mL をビーカーに分取し、0.1 mol/L HNO₃ 20 mL と 7% H₂O₂ 10 mL を加え、テフロン製時計皿をかぶせて約130℃のホットプレート上で有機物を分解した。必要に応じて逐次、HNO₃ および H₂O₂ 1~2 mL を加えて有機物を分解した後に時計皿を取り、HNO₃ および H₂O₂ を揮散させ0.1 mol/L HNO₃ 約 5 mL で残渣を加熱溶解後、10 mL とし試料溶液とした。この試料溶液のモリブデン吸光度を、試料を直接測定する場合と同じ条件で測定し、比較・検討

を行った。結果を表3に示す。乳試料を前処理した後に、Pd修飾剤を用いて測定を行ったモリブデンの測定値は、 $33.6 \pm 0.71 \mu\text{g/L}$ であった。修飾剤の有無の比較では、測定値に約30%の差が生じた。また、直接測定した乳試料中のモリブデン濃度は、 $37.2 \pm 0.57 \mu\text{g/L}$ であった。今回、前処理した乳試料の測定値が、直接測定の測定値よりも10%ほど低値を示したのは、前処理の段階で乳試料の脂肪分が容器等に付着したためと考えられ、分解容器をテフロン容器に変更し、脂肪分の分解を繰り返すなど、前処理においてモリブデンの損失を招かない工夫が必要である。

表3 乳試料中のモリブデン濃度

前処理済		直接測定
修飾剤なし	修飾剤(Pd)あり	
26.1 ± 2.4	33.6 ± 0.7	37.2 ± 0.6

(単位: $\mu\text{g/L}$)

3.5 添加回収試験

3.1~3.3の結果より得られた最適条件に従い、モリブデンの添加回収試験を行った。マトリックス修飾剤としてPdを用い、乳試料に $10 \mu\text{g/L}$ のモリブデン標準溶液を添加して前処理および測定を行ったところ、 $93.4 \pm 8.9\%$ の回収率を得た。完全回収に向けての課題はあるが概ね良好な結果を示し、乳試料の定量に適用可能であることを確認した。

3.6 母乳及び市販調製粉乳中のモリブデン定量

3.1~3.3で最適化した条件に従い、母乳および市販調製粉乳中のモリブデン濃度を測定した。標準粉乳試料が、牛乳から水分を除き乾燥させた全粉乳の組成であるのに対して、人工調製粉乳は、牛乳から脂肪分を除き、植物性脂肪やビタミン、無機栄養ミネラルを配合した組成となっている。本研究では、月齢4~5ヵ月までの乳児用粉乳(森永乳業株式会社 MD 森永ドライミルク はぐくみ)と、月齢9ヵ月以降の乳児用フォローアップミルク(森永乳業株式会社 MD フォローアップミルク 森永チルチルあゆみ)の2種類を用いた。測定結果を表4に示す。今回測定を行った母乳中のモリブデン濃度は $2.8 \pm 0.4 \mu\text{g/L}$ であった。厚生労働省の食事設置基準[4]によると、日本人の母

乳中のモリブデンの濃度は、 $0.8 \sim 34.7 \mu\text{g/L}$ (中央値 $2.9 \mu\text{g/L}$) および 0.1 未満~ $25.91 \mu\text{g/L}$ (中央値 $3.18 \mu\text{g/L}$) という報告がある[5,6]。濃度の範囲は広いものの、今回測定した母乳試料は、両報告の中央値に近い結果を示した。また、月齢4~5ヵ月までの乳児用粉乳および月齢9ヵ月以降の乳児用フォローアップミルク中のモリブデン濃度は、それぞれ $15.9 \pm 1.4 \mu\text{g/L}$ および $16.5 \pm 1.6 \mu\text{g/L}$ であった。

表4 母乳および市販調製粉乳中のモリブデン濃度

母乳	市販調製粉乳 月齢4~5ヵ月用	市販調製粉乳 フォローアップ用
2.8 ± 0.4	15.9 ± 1.4	16.5 ± 1.6

(単位: $\mu\text{g/L}$)

4 まとめ

乳試料の前処理は脂肪分を含むため処理時間を要し、処理過程での汚染や前処理の煩雑さがある。本研究では酸化処理剤として $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ を用い、黒鉛炉内で繰り返し乳試料を酸化分解することにより、事前の前処理を行わずに迅速、簡便に乳試料中のモリブデンの定量を行うことが可能となった。本方法については他元素への応用も考えられ現在検討を行っている。本法が、乳試料のモリブデン測定の標本数を増やすための一助となることを期待する。

参考文献

- 1) 田中 久, 桜井弘, 「生物無機化学」 廣川書店
- 2) 日本化学会, 微量元素 一栄養と毒性一, 丸善株式会社 (1975)
- 3) 保田和雄, 原子スペクトル分析の実際, 講談社 (1993)
- 4) 厚生労働省, 「日本人の食事摂取基準」(2010年版), <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/05/s0529-4.html>
- 5) 吉田宗弘, 伊藤智恵, 服部浩之, 他, 日本における母乳及び調製粉乳中のモリブデン濃度と乳児のモリブデン摂取量, 微量栄養素研究, 21, 59-64 (2004)
- 6) Yoshida M, Tanaka A, Hirose J, et al., "Molybdenum and chromium concentrations in breast milk from Japanese women", Biosci. Biotechnol. Biochem., 72, 2247-50 (2008)