

## HPLC-ICP-MS による食品および動物飼料中の無機ヒ素 (iAs) の高速測定

iAs の分析に関する EU 規制と 2 件の CEN 規格に準拠したメソッド



### 著者

Ana Jerše, Julie Storm Høgsbro,  
and Jens J. Sloth<sup>1</sup>  
Raquel Larios<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Food Institute,  
Technical University of Denmark  
(DTU Food)\*, Denmark

<sup>2</sup>Agilent Technologies,  
Madrid, Spain

### はじめに

ヒ素 (iAs) は、有機ヒ素種よりも無機形態の亜ヒ酸塩、As (III) とヒ酸塩、As (V) の 2 種類が毒性が高いことがよく知られています (1)。As 種の毒性の違いは、多くの国の規制で食品および動物飼料中の iAs 含有量を規定する必要性が示されている理由となっています。例えば、欧州 (EU) 委員会規則 1881/2006 (2) では、米と米製品に含まれる iAs の最大レベルを 0.1 ~ 0.3 mg/kg としています。欧州指令 2002/32/EC (3) では、海藻を含む飼料など、特定の動物飼料における iAs 含有量を 2 mg/kg 未満に規定しています。欧州委員会は、その他の食品、特に広く消費されている飲料水、牛乳、乳製品などにおいて iAs の最大レベルを確立する見込みです。これらの食品は、食事を通じた iAs の総摂取量に大きく関与している可能性があります。

HPLC-ICP-MS はヒ素スペシエーション調査に広く使用されています。しかし、一般的に As 種の分離には長いカラムが必要で、測定に 10 分以上かかります。測定時間を大幅に短縮するために、Jackson

\*飼料と食品中の金属と窒素化合物のための EU Reference Laboratory を主催

(4) によって高速 HPLC-ICP-MS メソッドが開発され、Gray などがさらに修正を施しました (5)。これらのメソッドによって、米 (6) やワインサンプル中の iAs の分析を適切に実施することができます (7)。

食品および動物飼料に含まれる iAs の公式対照分析にふさわしいルーチンメソッドを最適化するために、以前の研究をこの作業のベースとしました。また、メソッドは、食品および飼料中の iAs の測定に関して、現在の欧州規制に準拠し、2 件の CEN 規格の分析要件を満たす必要もあります。2 件の CEN 規格とは、EN16802:2016 (食品) (8) と prEN17374:2019 (動物飼料) (9) です。2 件の CEN 規格に明記されているサンプル前処理ガイドラインでは、食品と動物飼料に含まれる iAs の測定を簡易化する、抽出手順中の As (III) から As (V) への酸化を規定しています。

この研究では、2 分以内に iAs (As (V)) からジメチルアルシノ酸 (DMA) とモノメチルアルシノ酸 (MA) を分離するために、クロマトグラフィー条件を最適化しました。メソッドの最適化と評価は、Agilent 1260 HPLC に Agilent 8900 トリプル四重極 ICP-MS (ICP-QQQ) と組み合わせて実施しました。ICP-QQQ ではコリジョンガスとしてヘリウム (He) を使用し、シングル四重極モードで動作させたため、メソッドはシングル四重極 ICP-MS により実行することも可能です。検出下限 (LOD) および定量下限 (LOQ)、直線性、添加回収率、精度、真度など、メソッドの分析性能を検査しました。メソッドは、適切な飲料、食品、動物飼料の参照物質 (RM) により検証しました。

## 実験方法

### 試薬および標準物質

ICP-MS 用の As (V) 標準溶液は SCP Science (カナダ) から購入しました。As (III) 溶液および DMA 塩は Sigma Aldrich (米国) から、MA は Santa Cruz Biotechnology (米国) から購入しました。アルセノベタイン (AB) は認証標準物質 (ERM-AC626) で、欧州標準物質・計測研究所 (IRMM、ベルギー) から購入しました。移動相には、炭酸アンモニウム ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、微量金属グレード 99.999 %、Alfa Aesar、米国) とメタノール (HPLC グレード、VWR Chemicals、米国) を使用しました。

As (V) 標準液 (iAs を表す) は、希釈液として移動相を使用して、0.05 から 50 µg/L で 2 回調製しました。有機化合物からの iAs ピークの分離を確認するために、標準溶液に MA と DMA も添加しました。iAs ピークからの AB 標準のピークの分離も検査しました。サンプル前処理段階中の As (V) に対する定量的な酸化を示すために As (III) 標準を使用しました (データは示していません)。

### 標準物質およびサンプル

この研究に用いたサンプルと RM のリストを表 1 に示しています。RM の一部の iAs 濃度は、認証値、参照値、または共同研究や技能試験で確立された値です。

表 1. 研究で使用したサンプルおよび参照物質の概要

サンプル/RM (正式名)	サンプル/RM (略称 <sup>a</sup> )	iAs 濃度 (mg/kg)	備考
プラスチック製ボトルの水 (市販サンプル)	ボトル飲料水	-	-
リンゴジュース (市販サンプル)	リンゴジュース	-	-
米 (ERM-BC211)	米	0.124 ± 0.011 <sup>b</sup>	認定値
白米粉 (NMIJ CRM 7503-b)	白米粉	0.153 ± 0.010 <sup>b</sup>	認定値
玄米粉 (NMIJ CRM 7533-a)	玄米粉	0.530 ± 0.016 <sup>b</sup>	認定値
ニラネギ (DTU 食品)	ニラネギ	0.086 ± 0.012 <sup>c</sup>	共同研究
チリパウダー (FAPAS T07288QC)	チリパウダー	0.775 ± 0.024 <sup>d</sup>	技能試験
ウシ肝臓 (ERM-BB185)	ウシ肝臓	-	-
魚タンパク質 (NRCC-DORM-4)	魚タンパク質	0.27 ± 0.038 <sup>c</sup>	共同研究
ムール貝 (DTU 食品)	ムール貝	0.33 ± 0.049 <sup>c</sup>	共同研究
完全に海産物ベースの飼料 (DTU 食品)	海産物ベースの飼料	0.802 ± 0.122 <sup>c</sup>	共同研究
混合トウモロコシ養鶏用飼料 (FAPAS)	混合トウモロコシ養鶏用飼料	0.299 ± 0.010 <sup>d</sup>	技能試験
昆布パウダー (NIST SRM 3232)	昆布パウダー	0.247 ± 0.019 <sup>e</sup>	参照値
ひじき (NMIJ 7405a)	ひじき	10.1 ± 0.5 <sup>b</sup>	認定値

<sup>a</sup>... 文書ではサンプルと RM の略称を使用

<sup>b</sup>... 包含係数 k = 2 の拡張不確かさ (約 95 % の信頼性レベル)

<sup>c</sup>... 共同研究 (複数のラボから複製) からのすべての結果の標準偏差

<sup>d</sup>... すべての結果の標準偏差と参加者数に基づき技能試験で決定された不確かさ

<sup>e</sup>... 包含係数 k = 2.36 の拡張不確かさ

### サンプル前処理

2 件の CEN 規格に明記されたサンプル前処理ガイドラインに従いました (8, 9)。すべての固体サンプルに、抽出液として 0.1 M HNO<sub>3</sub>/3 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を使用しました。約 0.2 g の固体サンプルを 10 mL の抽出液と混和しました。1:1 の割合でサンプルと混和した後に同じ酸濃度を得るために、液体サンプルに対し、より高い濃度の抽出液を調製しました。5 mL の液体サンプルをより高濃度の抽出液 5 mL (0.2 M HNO<sub>3</sub>/6 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) と混和しました。90 °C で 60 分間、ウォーターバスでサンプルを加熱してから、抽出物を 4000 rpm で 10 分間遠心分離しました。上清をフィルタバイアル (0.45 µm ポアサイズ) に移しました。分析の前に抽出物を含むバイアルを 4 °C で冷蔵保存しました。ひじきサンプルの iAs 含有量は高いため (10.1 ± 0.5 mg/kg)、分析の前に抽出物を抽出液でさらに 20 倍に希釈し、ろ過しました。

## 装置構成

バイナリポンプ搭載 Agilent 1260 HPLC を Agilent 8900 ICP-QQQ と組み合わせました。HPLC に PRP-X100 (5 μm, 50 x 2.1 mm) カラムおよび対応の PRP-X100 分析用ガードカラム (Hamilton 社、米国) を取り付けました。8900 ICP-QQQ には、ガラス製同軸ネブライザ、石英製スプレーチャンバ、内径 2.5 mm インジェクタ付き石英トーチ、ニッケル製インタフェースコーンからなる標準的なサンプル導入システムを装着しました。ICP-QQQ はシングル四重極モードで動作させました。<sup>40</sup>Ar <sup>35</sup>Cl による <sup>75</sup>As への潜在的な干渉を解消するために、ORS<sup>4</sup> コリジョンリアクションセル (CRC) でコリジョンガスとしてヘリウムを使用しました。8900 はシングル四重極 ICP-MS よりも優れた感度と検出下限を提供しますが、ORS<sup>4</sup> を搭載した Agilent 7800 または 7900 ICP-MS でメソッドを実行することも可能です。機器の使用条件を表 2 に示します。

表 2. HPLC-ICP-MS の動作条件

ICP-MS	
RF 出力 (W)	1550
ネブライザガス (L/分)	1.06
サンプリング深さ (mm)	8
スプレーチャンバ温度 (°C)	2
ペリスタルティックポンプスピード (rps)	0.5 <sup>a</sup>
スキャンモード	シングル四重極
He セルガス流量 (mL/min)	3.5
モニタリングされた m/z	<sup>75</sup> As、 <sup>35</sup> Cl
HPLC	
カラム温度	室温
注入量 (μL)	5
移動相	40 mM 炭酸アンモニウム/ 3% メタノール、pH 9
溶出	イソクラティック
移動相流量 (mL/min)	0.65
分析時間 (分)	5 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> ... ドレイン専用

<sup>b</sup> ... iAs ピークの後に他の化合物が溶出しないよう、分析時間は 5 分に設定しました。

図 1 および図 2 には、クロマトグラム全体は表示されていません。

## 結果と考察

### 高速メソッドの最適化

メソッドは、2 件の過去の研究で使用された手法をベースとしました (4, 5)。比較的短いアニオン交換カラムに小さい粒子を充填することにより、高い移動相流量と低容量注入を使用できるようにしました。

0.45、0.5、0.55、0.65 mL/min の複数の移動相流量を試験しました。ピークの分離を損なうことなく、0.65 mL/min でヒ素化合物を最速で溶出することができました。高い背圧によりリークが観察されたため、高流量は試験しませんでした。As (III) を As (V) になるまで酸化したため、測定される As 種が少なくなり、より強力な移動相を使用することができました。

図 1 および図 2 に示されているように、クロマトグラフィーメソッドにより、分離能を低下させずに、2 分未満で他のヒ素種から iAs をベースラインで分離することができました。図 1 は、個々のヒ素種標準のクロマトグラムを重ね合わせたもので、図 2 は 0.05 ~ 50 μg/L の標準溶液のクロマトグラムを重ね合わせたものです。図示されているとおり、iAs (As (V)) は他の As 種から適切に分離されました。

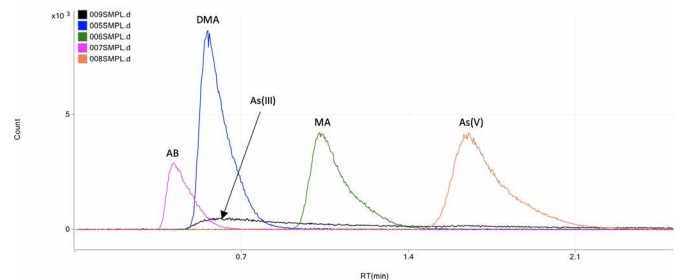


図 1. 個々の As 種標準のクロマトグラムの重ね表示

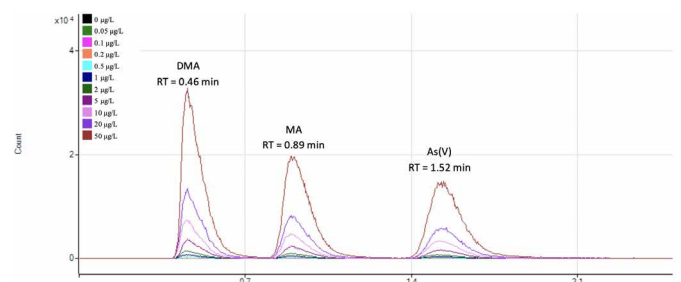


図 2. 移動相で 0. ~ 50 μg/L で調製された標準溶液のクロマトグラムの重ね表示

ICP-MS でコリジョンガスとしてヘリウムを使用して、 $^{75}\text{As}^+$  に対する  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$  による潜在的な干渉を解消しました。 $\text{Cl}^+$  および  $\text{As}^+$  のリテンションタイム (RT) をチェックするために、両方のイオンをそれぞれ  $m/z$  35 と  $m/z$  75 でモニタリングしました。図 3 では、塩素のピーク (黒色のクロマトグラム) の RT が As (V) のピーク (緑色のクロマトグラム) から区別されており、EN16802:2016 および prEN17374:2019 に記載の要件の 1 つに準拠していることが示されています。緑色のクロマトグラムにおいて Cl の RT でピークがないのは (MA が部分的に Cl のピークにオーバーラップしているが)、He モードで  $^{35}\text{Cl}^{40}\text{Ar}^+$  が取り除かれたことを示しています。

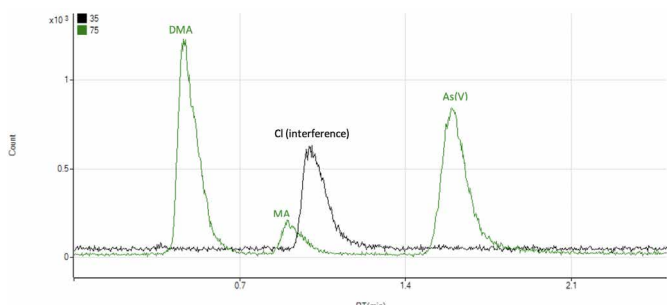


図 3. As 種 (緑色のクロマトグラム) と塩素のピーク (黒色のクロマトグラム) の RT を示した米 ERM-BC211 のクロマトグラム

### 直線性に優れた検量線

図 4 に示すように、iAs (As (V)) の検量線は優れた直線性を示しました。

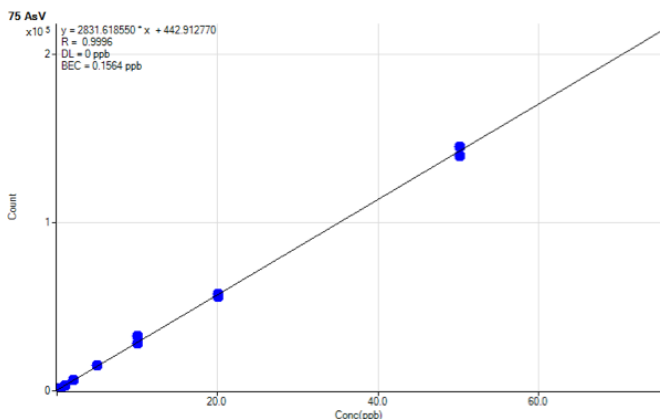


図 4. iAs (As (V) で示された) の検量線

### 検出下限および定量

LOD および LOQ を評価するために、抽出液のブランクサンプルを 10 個分析しました。ブランクサンプルの As 汚染物質の iAs ピークを統合し、溶液の LOD と LOQ はそれぞれ 3 倍および 10 倍の標準偏差を使用して計算しました。サンプルの LOD と LOQ も計算しました。固体サンプルの値は、10 mL の抽出液で抽出された 0.2 g の測定試料サイズに基づいています。液体サンプルの値は、抽出液で 10 mL に希釈された 5 mL のサンプルに基づいています。すべての LOD と LOQ を表 3 に示します。

表 3. 溶液、固体および液体サンプルで計算された iAs の LOD と LOQ

	溶液中の iAs (μg/L)	固体サンプル中の iAs (μg/kg)	液体サンプル中の iAs (μg/L)
LOD	0.040	1.99	0.08
LOQ	0.133	6.64	0.27

6.64 μg/kg の固体サンプルの LOQ 値 (0.0066 mg/kg) は、食品 (米) 中の iAs 測定値を 0.04 mg/kg 未満とした欧州規制を満たしています (10)。LOQ はまた、動物飼料に対して欧州規制で規定されている 2 mg/kg の iAs 最大値を大きく下回っています (3)。メソッドの感度は、食品および動物飼料に含まれる iAs の公的管理に十分対応します。

### 添加回収率およびマトリックス効果の評価

2 つの異なる濃度レベルで複数のサンプルに iAs を添加し、可能性のあるマトリックス効果の評価しました。ボトル飲料水、リンゴジュース、ウン肝臓は、これらのサンプルに対して iAs 含有量に関する事前情報がないため、「未知」のサンプルとして選択しました。他の 2 つのスパイクしたサンプル (ニラネギおよびムール貝) の iAs 濃度は、共同研究から取得しました。

表 4 は、リンゴジュース以外のすべてのサンプルで、添加回収率が 100 ± 10 % の範囲に収まっていることを示しています。リンゴジュースの回収率は、低濃度および高濃度のスパイクレベルの両方で 100 ± 10 % の範囲外となり、マトリックス効果を示しています。

表 4. 選択したサンプル中の iAs の添加回収率

サンプル	低添加濃度 (μg/L)	添加回収率 (%)	高添加濃度 (μg/L)	添加回収率 (%)
ボトル飲料水	0.5	109 ± 9	1	90.0 ± 0.6
リンゴジュース	0.5	119 ± 1	1	111 ± 1
ウン肝臓	0.5	110 ± 3	1	104 ± 5
ニラネギ	2	102 ± 10	5	106.7 ± 0.7
ムール貝	5	95 ± 16	10	96 ± 4

外部検量線（実線）の傾きを、標準添加法による検量線（点線、図 5）の傾きと比較しました。比較のために、標準添加法による検量線の傾向線を示しています。ほとんどのサンプルで、外部検量線と標準添加法による検量線の傾きの差は 10 % 未満でした。このような小さな差は、これらのマトリックスに対して小さいマトリックス効果に過ぎないことを示しており、これらのサンプルにおいて iAs の定量に外部標準を使用することが可能です。ただし、リンゴジュースの 2 つの傾きの差は 20 % を上回るため、リンゴジュースの iAs の定量には標準添加法が必要です。

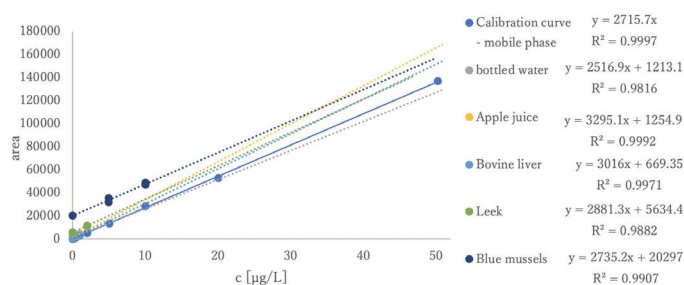


図 5. 外部検量線の傾きと、標準添加法による検量線の傾きとの比較

表 5. %RSD と回収率を含む、サンプルと RM 中の iAs 含有量の定量結果

サンプル/RM	目標値 (µg/kg)	外部検量線			標準添加法	
		測定濃度 (µg/kg)	RSD (%)	回収率 (%)	測定濃度 (µg/kg)	回収率 (%)
ボトル飲料水 <sup>a</sup>	-	0.81 ± 0.08 <sup>b</sup>	9.4	-	0.96 <sup>b</sup>	-
リンゴジュース <sup>a</sup>	-	0.85 ± 0.06 <sup>b</sup>	6.8	-	0.76 <sup>b</sup>	-
米	124 ± 11	119 ± 3	2.1	96 ± 2	-	-
白米粉	153 ± 10	151 ± 2	1.0	99 ± 1	-	-
玄米粉	530 ± 16	496 ± 9	1.8	94 ± 2	-	-
ニラネギ	86 ± 12	95 ± 2	1.8	111 ± 2	87	101.6
チリパウダー <sup>a</sup>	775 ± 24	860 ± 30	3.6	111 ± 4	-	-
ウシ肝臓	-	12.5 ± 0.8	6.5	-	12	-
魚タンパク質	270 ± 38	272.4 ± 0.8	0.3	100.9 ± 0.3	-	-
ムール貝	330 ± 49	337 ± 4	1.3	102 ± 1	350	106.1
海産物ベースの飼料 <sup>a</sup>	802 ± 122	650 ± 30	4.1	82 ± 3	-	-
混合トウモロコシ養鶏用飼料 <sup>a</sup>	299 ± 10	293 ± 5	1.7	98 ± 2	-	-
昆布パウダー	247 ± 19	230 ± 20	7.5	94 ± 7	-	-
ひじき	10100 ± 500	8800 ± 600	7.0	88 ± 6	-	-

<sup>a</sup>... 乾物補正なし

<sup>b</sup>... 単位 µg/L

## 精度および真度

すべてのサンプルと RM は 3 回繰り返して前処理し、同じ日に分析しました。3 回の繰り返し分析の結果を使用してメソッドの精度を評価しました。これは、相対標準偏差 (RSD) として報告されます。メソッドの真度を評価するために、3 回の繰り返し分析の平均を RM 目標値と比較しました。結果は回収率として報告されます。

複数のサンプル中の iAs の測定結果を表 5 に示しています。移動相で作成した外部検量線、および選択したサンプルに対して作成した標準添加法による検量線を使用して、回収率を計算しました。iAs の元の検量線は、QC チェック標準を分析することで、シーケンスを通じて定期的に更新しました。

測定の精度は 0.3 ~ 9.4 % RSD、iAs 回収率は認証値、参照値、説明値の 81.8 ~ 110.7 % の範囲でした。結果は、メソッドがこの研究におけるさまざまな飲料、食品、飼料サンプルの分析に適切であることを示しています。



図 6 は複数のサンプルマトリックスのクロマトグラムです。各クロマトグラムは、EN16802:2016 および prEN17374:2019 標準メソッドに記載されている要件を満たしていますが、それはクロマトグラムが次を示す必要があります：

1. 他のヒ素化合物から、ヒ酸塩 (As (V)) が選択的に分離されている。
2. As (V) が、10 % のピーク高さにおいて、一番近いピークからピーク幅全体で分離されている。
3. As (V) が塩素のピークから分離されている (図 3 を参照)。

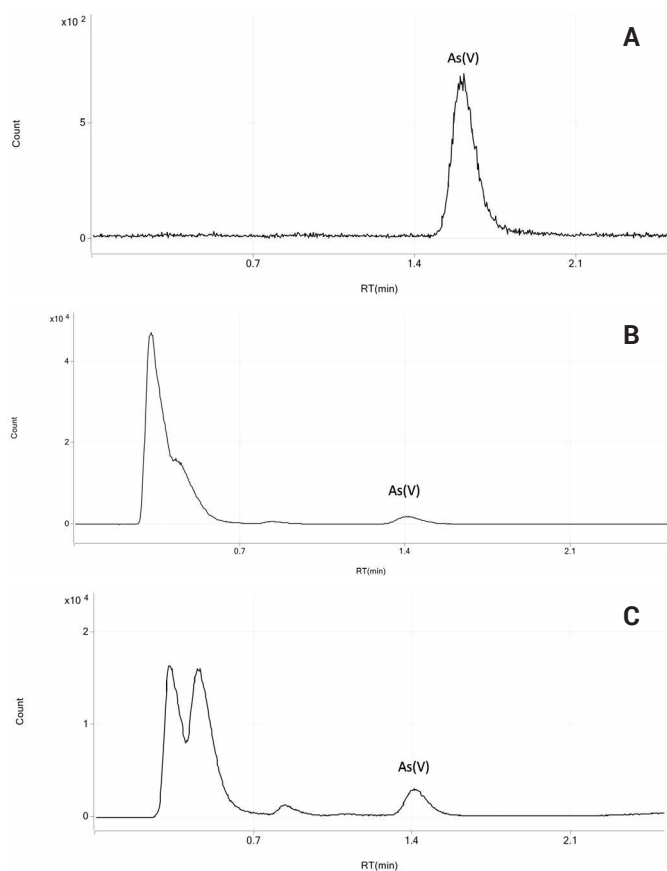


図 6. 複数のサンプルマトリックスのクロマトグラム  
 A：ニラネギのクロマトグラム (DTU 食品)  
 B：魚タンパク質のクロマトグラム (NRCC-DORM-4)  
 C：ムール貝のクロマトグラム (DTU 食品)

このアプリケーションノートで提示されたデータは数日にわたり分析され、移動相の組成やカラムの条件における小さな違いによって、シーケンス間の RT にある程度の変動が生じました。しかし、表 6 に示されているように、各サンプルシーケンス内の RT は優れた安定性を示しました。

表 6. 3 つのサンプルシーケンスに対する、すべての標準およびサンプルの iAs ピークのリテンションタイム安定性

	平均 RT (分)	RSD (%)
シーケンス 1 (n = 45)	1.61	1.24
シーケンス 2 (n = 61)	1.41	1.28
シーケンス 3 (n = 82)	1.85	1.73

## 結論

高速 HPLC-ICP-MS メソッドは、飲料、食品、動物飼料マトリックスに含まれる iAs の分析のために最適化しました。小さな注入量、短いイオン交換カラム、強度の高い移動相、サンプル前処理中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による As (III) の As (V) への酸化を用いることで、2 分未満で iAs を測定できました。分析時間の高速化により、従来のイオン交換カラムを使用したメソッドと比較し、サンプルスループットが大幅に向上しました。

有機 As 種からの As (V) の明確な分離と、Agilent 8900 ICP-QQQ を使用した検出を経て、iAs に対して 1.99 µg/kg (固体サンプル) および 0.08 µg/L (液体サンプル) の LOD が得られました。LOQ は、食品および飼料サンプル中の iAs の分析に関して欧州規制で確立された LOQ よりも低くなりました。iAs の認証値、参照値、説明値のある複数のマトリックスのいくつかの参照物質は、優れた真度 (81.8 ~ 110.7 %) と精度 (0.3 ~ 9.4 % RSD) で分析することができました。

HPLC-ICP-MS メソッドは、欧州規制に準拠し、CEN 規格の分析要件に適合するため、食品および動物飼料中の iAs の公的管理に最適です (8, 9)。iAs の毒性を考えると、この高速なルーチンメソッドは、広く消費されている製品の安全性に関して有益な情報を提供します。また、食品や飼料の製造業者が、製品に含まれる iAs の分析に関する規制要件に対応できるようにします。

## 参考文献

1. European Food Safety Authority, Scientific opinion on arsenic in food, EFSA Journal, 2009, 7, 1351
2. European Union Commission, 2006, Regulation (EC) No. 1881/2006 and later amendments
3. European Union Commission, 2002, Directive 2002/32/EC and later amendments
4. B. P. Jackson, Fast ion chromatography-ICP-QQQ for arsenic speciation, J. Anal. At.Spectrom., **2015**, 30, 1405–1407
5. P. J. Gray, C. K. Tanabe, S. E. Ebeler, J. Nelson, A fast and fit-for-purpose arsenic speciation method for wine and rice, J. Anal. At.Spectrom., **2017**, 32, 1031–1034
6. C. K. Tanabe, S. E. Ebeler, J. Nelson, Fast Analysis of Arsenic Species in Infant Rice Cereals using LC-ICP-QQQ, Agilent publication, [5991-9488EN](#)
7. C. K. Tanabe, H. Hopfer, S. E. Ebeler, J. Nelson, Fast Analysis of Arsenic Species in Wines using LC-ICP-QQQ, Agilent publication, [5991-8454EN](#)
8. EN 16802:2016: Determination of inorganic arsenic in foodstuffs of marine and plant origin by anion-exchange HPLC-ICP-MS
9. PrEN 17374:2019: Determination of inorganic arsenic in animal feed by anion-exchange HPLC-ICP-MS
10. European Union Commission, 2007, Regulation (EC) No. 333/2007 and later amendments

## 謝辞

技術サポートを提供してくれた Michiko Yamanaka (Agilent) に感謝いたします。

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタマコンタクトセンタ

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE.2308449074

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2019

Printed in Japan, December 23, 2019

5994-1642JAJP