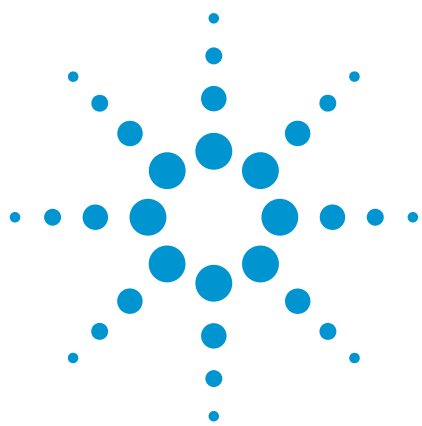




HPLC-ICP-MS 法による 食品中の水銀のスペシエーション

アプリケーションノート

食品分析

著書

Sébastien Sannac, Yu-Hong Chen,
Raimund Wahlen, Ed McCurdy

Agilent Technologies
Manchester, UK



概要

水銀は、生物にとってもっとも毒性の高い元素の 1 つです。そのため、信頼性の高い定量分析がきわめて重要となります。水銀の環境中の濃度は比較的低いですが、食物連鎖を通じて濃縮され、一部の食品中では、最終的な濃度が極めて高くなる場合があります。また、水銀の毒性は、総水銀濃度と化学種の両方によって決まります。そのため、食品分析において、人体に対する水銀の毒性を完全に評価するためには、水銀のスペシエーション (形態別分析) が必要となります。



水銀の分析では低い検出下限が求められるため、おもに GC-ICP-MS メソッドが用いられます。しかし、最先端の ICP-MS システムは感度が向上しているため、最近では、HPLC を用いた低濃度の Hg のスペシエーションも実用的な選択肢となっています。HPLC と ICP-MS の組み合わせは、両機器の接続が簡単であるという点で魅力的です。また、GC 分析とは異なり、水銀の誘導体化をおこなわずに、サンプルを直接 HPLC システムに注入できます。サンプルを直接注入することにより、サンプル前処理が大幅に簡略化され、化学種の変化の可能性を最小限に抑えられるほか、分析手順全体のコストも削減できます。



Agilent Technologies

本アプリケーションノートでは、HPLC-ICP-MS 法を用いて食品中の水銀のスペシエーション分析を行いました。毒性という点で問題となる化合物は、おもに無機水銀 (Hg^{2+}) とメチル水銀 (MeHg^+) ですが、本研究では、エチル水銀 (EtHg^+) やフェニル水銀 (PhHg^+) など、局所的に存在する可能性のある他の水銀種にまでメソッドの対象範囲を拡張しました。分離は、化学種の溶出を加速するため、有機溶媒のグラジエント法を用いて行いました。Agilent 7700/7800 ICP-MS システム特有の、プラズマ RF ジェネレータの高周波数マッチング機能のおかげで、プラズマの安定性を保ちながら水溶液サンプルと有機溶媒の切替が可能です。メソッドの検証は認証標準物質 (CRM) を用いて行いました。

実験

装置条

クロマトグラム分離は Agilent 1260 HPLC を用いて行われました。Agilent 1260 HPLC は 600 bar 耐圧の高分解能液体クロマトグラフィーを実現し、小さな粒子径のカラムにも対応できます。分離に使われたカラムは、アジレント製 Zorbax C-18、4.6 x 50 mm、粒子径 1.8 μm でした。HPLC の測定パラメータを表 1 に示します。分離条件は、参考文献 1 (Hight *et al.*) を参考に最適化しました。

表 1. Agilent 1260 HPLC システムの測定パラメータ

パラメータ	値
流量	1 mL/min
注入量	50 μL
移動相: A	0.5 g/L L-システイン 0.5 g/L L-システイン、 HCl、 H_2O (HCl にて pH = 2.3 に調整)
B	メタノール

Agilent 7700x ICP-MS を用いて、推奨される同位体である ^{201}Hg で水銀を測定しました。酸素ガス (20 % O_2 /アルゴンの混合ガス) を、7700x のオプション装備であるマスフローコントローラを使用してキャリアガスに加えました。プラスマに酸素を加えることにより、インターフェースコーンへのカーボンの付着を抑え、ICP-MS に有機溶媒を直接導入することができます。有機溶媒導入の際に用いられる、酸素耐性の白金コーンと、1.0mm ID インジェクターーチを使用しました。7700x ICP-MS の測定パラメータの詳細を表 2 に示します。

表 2. Agilent 7700x ICP-MS の測定パラメータ

パラメータ	値
RF 出力	1600 W
キャリアガス流量	0.54 L/min
メイクアップガス流量	0.10 L/min
オプションガス (Ar 中 20 % O_2)	0.06 L/min
スプレーチャンバ温度	-5 $^{\circ}\text{C}$
サンプル深さ	8.0 mm

7700/7800 ICP-MS MassHunter ソフトウェアを用いると、Agilent LC や GC モジュールも操作することができ、図 1 に示してある通り、1260 HPLC メソッドやシーケンスも直接読み込み、動かすことができます。このソフトウェアを用いれば、双方向通信により HPLC と ICP-MS どちらかが停止した場合はシステムが完全停止するため、分析の安全性も向上します。

サンプルの前処理

2 つの CRM がメソッド検証に使われました。BCR-464 (IRMM、ベルギー) はマグロの筋肉で、認証値はメチル水銀で $5.12 \pm 0.16 \text{ mg (Hg)/kg}$ になり、総水銀量の 97 % を占めています。Dolt-4 (NRC、カナダ) はサメの肝臓で、 MeHg^+ が $1.33 \pm 0.12 \text{ mg (Hg)/kg}$ 含まれています (総水銀量の 52 %)。

抽出方法は参考文献 [2] に従って行いました。150 mg のサンプルを 20mL の移動相 A で抽出しました。抽出はマイクロウェーブで 140W で 11 分行いました。上澄み液を 0.45 μm のろ紙でろ過した後、HPLC に注入しました。

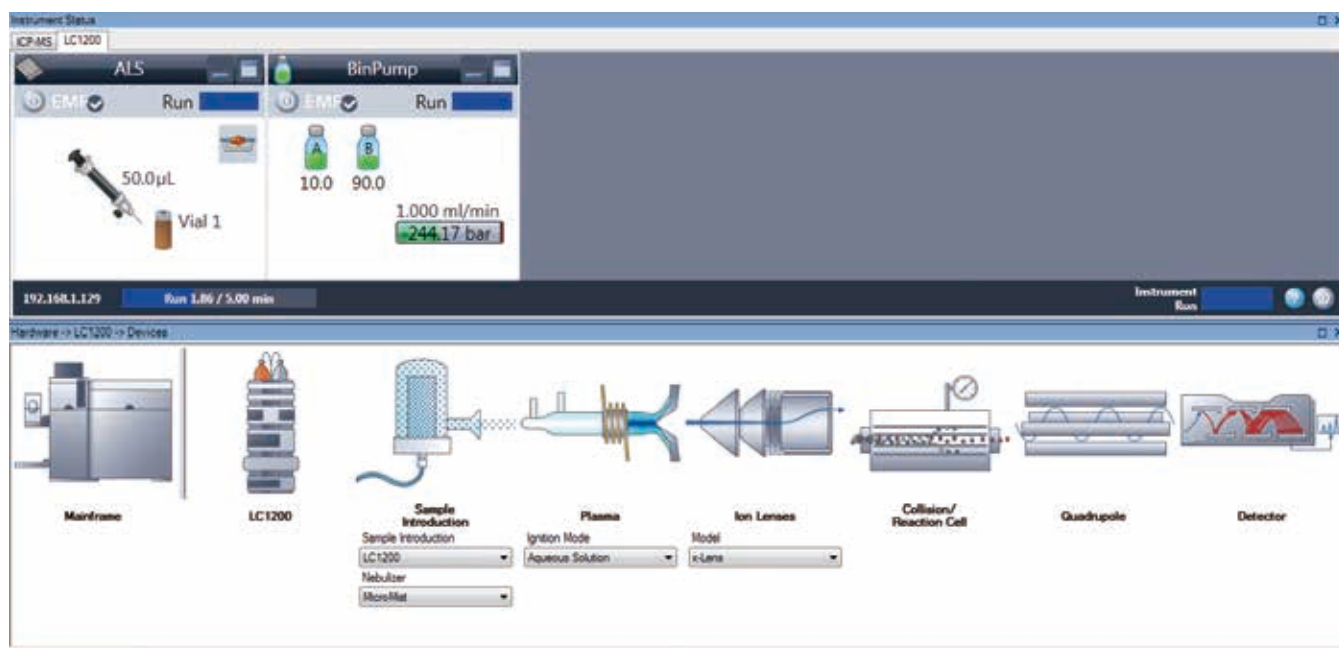


図 1. HPLC-ICP-MS 仕様の ICP-MS MassHunter ソフトウェア

結果と考察

クロマトグラムの最適化

はじめの測定は、アイソクラティック条件で 2 % メタノール (移動相 B) を移動相 A の L-システイン緩衝液に加えて行われました。結果を図 2 に示します。

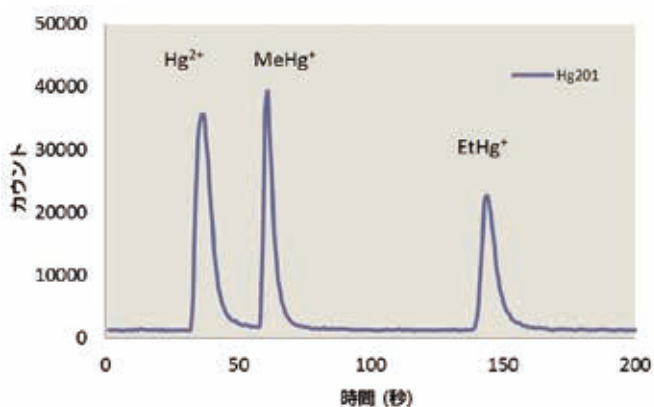
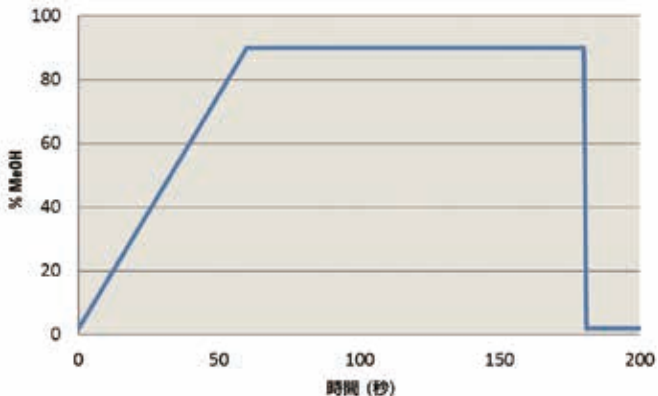


図 2. アイソクラティック条件下での水銀種の分離

このアイソクラティック溶出法により、3 つの水銀種を 3 分未満で、 Hg^{2+} と MeHg^+ は 2 分未満で分離することができました。しかし、フェニル水銀はカラムに吸着してしまい、検出できませんでした。よって、移動相の溶出性能を高めるために、グラジエント溶出を検

証しました。図 3 に示した通り、メタノール 2 % で開始し 1 分後にメタノール 90 % となる溶媒グラジエントで分離を行いました。

図 3. 分離中のグラジエント条件



このグラジエント溶出法により、4 つすべての水銀種を 3 分未満で分離することができました (図 4)。また、7700/7800 ICP-MS プラズマ RF ジェネレータの高周波数マッチング機能のおかげで、高速メタノールグラジエントでもプラズマの安定性は乱されませんでした。分離の最後で移動相は 2 % メタノールに切り替わりましたが、プラズマの安定性には問題はありませんでした。

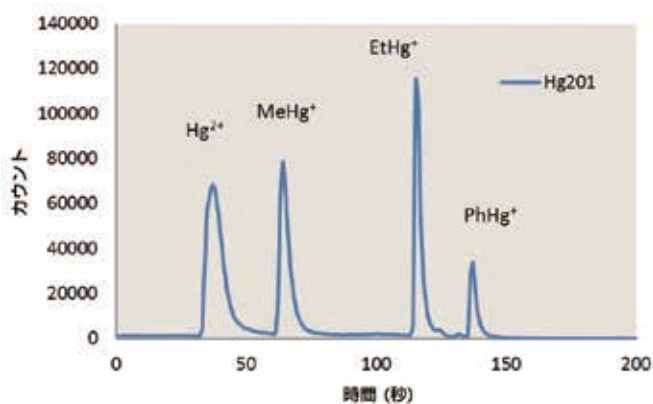


図 4. グラジエント条件下での水銀種の分離

HPLC-ICP-MS システムのパフォーマンス

サンプル抽出物の分析に先立ち、約 100 ng/L (ppt)～10 µg/L (ppb) の 4 種類の水銀種の混合物を用いて、検量線を作成しました。

図 5 に、検量線を示します。検量線は全ての化学種において優れた直線性を得ることができました。また、図 5 にバックグラウンド相当濃度 (BEC) を示します。すべての水銀種で、BEC は 20 ng/L 未満でした。この低い BEC は、移動相に起因する汚染がほとんどなく、このシステムにより低濃度の水銀を検出できることを示しています。

サンプル分析

最適なグラジエント溶出メソッドを用いて、2 つの認証参照物質 (CRM) を 3 回繰り返し分析しました。各 CRM について、n=3 でサンプルを抽出しました。また、操作ブランクを測定したところ、測定可能な汚染物質は検出されませんでした。表 3 に、サンプルの分析結果を示します。

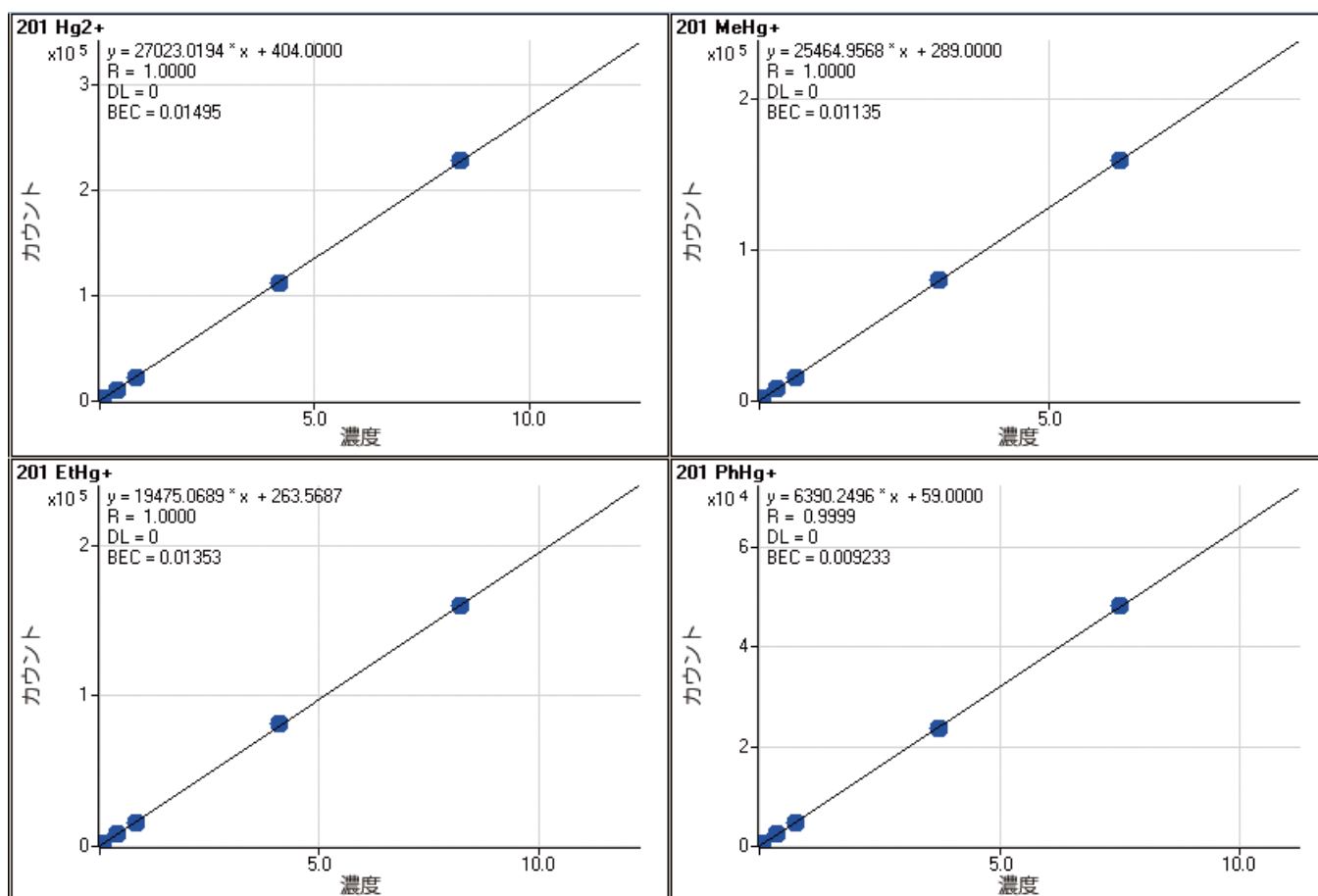


図 5. 4 種類の水銀種分析の検量線

表 3. CRM サンプルの分析結果

* 認証値ではありません

	BCR-464	Dolt-4	
	201 MeHg ⁺	201 Hg ²⁺	201 MeHg ⁺
水銀測定値 (mg/kg)	4.93	1.17	1.34
RSD (%)	8	8	10
認証値	5.12 ± 0.16	(1.25)*	1.33 ± 0.12
回収率 (%)	96	94	101

MeHg⁺ では、いずれのサンプルでも測定値が認証値と良好に一致し、この新メソッドの有効性を実証する結果となりました。特に、MeHg⁺ 含有量が総水銀量のわずか 52 % である Dolt-4 サンプルで測定値と認証値が良好に一致したことから、この前処理手法によって抽出の際にも Hg の形態が変化せずに保たれていることがわかります。

結論

以上のことから、本研究で用いた食品サンプル中水銀種分析用の高速かつ高効率のグラジエント HPLC-ICP-MS メソッドにより、分析対象となる 4 つの水銀種を 3 分未満で完全に分離することができました。Hg 種の回収率も、認証値と比べて良好なものでした。フェニル水銀の測定が必要がない場合は、簡便なアイソクラティック条件のメソッドにすることも可能です。

メタノール 10 % から 90 % までの高速グラジエントに対応する Agilent 7700/7800 ICP-MS の高周波数マッチング RF ジェネレータにより、プラズマの安定性に悪影響を与えずに水銀種を分離することが可能です。この特長を活かし、有機溶媒を用いた更なる HPLC-ICP-MS メソッド分析が可能になります。

謝辞

CRM 抽出物の前処理にご協力いただいた国立計測実験研究所 (LNE、フランス) の Guillaume Labarraque 氏と Caroline Oster 氏に感謝します。

参考文献

1. Hight, S. C. & Cheng, J. (2006). *Anal. Chim. Acta.* 567:160–172.
2. Sannac, S., Labarraque, G., Fiscaro, P., Pannier, F. & Potin Gautier, M. (2009). *Accred. Qual. Assur.* 14:263–267.



www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる障害について一切免責とさせていただきます。

本書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2017
Published June 21, 2017
Publication number: 5991-0066JAJP



Agilent Technologies