

Agilent 8800 トリプル四重極 ICP-MS を 用いた HPLC-ICP-MS による、 リンゴジュース中のヒ素の スペシエーション分析

アプリケーションノート

食品と飲料

著書

田野島三奈*、酒井徹志*、
Ed McCurdy†

Agilent Technologies

* Tokyo, Japan

† Stockport, UK



概要

食品に含まれる有毒成分に関する話題は常に関心が高く、食品会社や規制機関は、迅速で信頼性の高いスクリーニングメソッドで食品や飲料中に含まれる不純物を正確に測定することを求めています。ヒ素 (As) の場合、食品中に含まれる濃度は、ヒ酸水素鉛 (II) やヒ酸カルシウムなど、ヒ素を含む農薬の使用頻度の増加により高くなってきています。これらの化学物質は、20 世紀に農産物の果菜類 (主にリンゴ) 収穫前に芯食い虫、リンゴミバエ、ミバエなどを殺傷するための殺虫剤として使用されてきました。これらの殺虫剤は 1970 年以降使用されなくなったものの、ヒ酸水素鉛 (II) やヒ酸カルシウムは土壌中で安定して長期間存在するため、未だ農作物に影響を及ぼす場合があります。



Agilent Technologies

ヒ素は、形態によって毒性が大きく異なるため、スペシエーション分析 (化学形態別分析) がとても重要です。無機体の亜ヒ酸 (As(III)) やヒ酸 (As(V)) は毒性が高く、発がん性物質として知られていますが、有機体のモノメチルアルソニン酸 (MMA) やジメチルアルソニン酸 (DMA) は毒性が低く、アルセノベタイン (AB) は無毒です。無機体のヒ素の濃度は、飲料水や食品、飲料、薬品、石油化学などのさまざまな分野でモニターされます。

HPLC を用いて As を含む化学種を分離し、ICP-MS で測定する方法は、飲料水や尿分析メソッドとして既に確立されています [1]。

本アプリケーションノートでは、リンゴジュース中に含まれる As の形態別ルーチン分析のメソッドを、フィルタ処理とイオン交換水希釈によるサンプル前処理も含めて開発しました。参考文献 1 のメソッドを用い、市販のリンゴジュース 6 種類のヒ素化合物の定量を行い、果実ジュースに含まれるヒ素の含有量が人体に影響を及ぼすレベルか否かを調べました。

米国環境保護庁 (USEPA : US Environmental Protection Agency) は、飲料水中の総ヒ素の最大汚染物質濃度 (MCL) を 10 µg/L と定めています。しかし、As は微量必須元素であるため、USEPA と欧州食品安全機関 (European Food Safety Authority) は 1 日 0.8 から 8 µg (体重 1 kg あたり) の摂取を推奨しています。As の栄養摂取源には海産物、米などがあります。

実験

サンプル処理

6 種類のリンゴジュース (リンゴジュース #1~#6) を日本の量販店にて購入しました。2 つのフィルタ (Millex-LH、Millipore、米国/TOYOPAK ODS M、TOSHO、日本) を用いてリンゴジュースサンプルをフィルタ処理しました。Millex-LH フィルタはリンゴジュース中の固形物を取り除くために用い、その後 TOYOPAK ODS M フィルタを用いて無極性化合物を取り除き、HPLC カラムへのオーバーロードを防ぎました。両フィルタとも、製造元の指示に従い、事前に洗浄、活性化を行いました。フィルタ処理後、サンプルを超純水により 2 倍に希釈しました。化学種間の相互変換を最小限に抑えるため、希釈倍率を低くして可能な限り良い検出下限が得られるようにしました。

はじめに、ブランクサンプルを用意し、サンプル処理の際に発生しうるコンタミネーションが、As のスペシエーション分析に影響がないか調べました。

1. イオン交換水ブランク
2. Millex メンブレンフィルタブランク
3. TOYOPAK ODS フィルタブランク
4. メソッドブランク (イオン交換水を 2 度フィルタに通しサンプルとしました)

上記 4 種類のブランクサンプルを参考文献 1 で記されているクロマトグラフィー用のカラム、移動相、HPLC メソッドを用いて測定しました。図 1 に 4 種類のブランクのクロマトグラムと、各 As 化学種の混合溶液 (それぞれの濃度は 50 ng/L (ppt)) を重ね書きして示しています。図から、サンプル処理過程でのブランクは、As の定量において影響を及ぼさないレベルであることがわかります。

最初にあるピークはアルセノベタイン (AB) で、カラムに吸着されないため、ボイドボリュームとして溶出します。また、このピークでは同じくカラムに吸着しない中性、陽イオンピークが同時に溶出する場合があります。AB は LC-ICP-MS で定量が可能ですが、サンプル中に存在する共存物によっては結果が異なる場合があります。しかし、AB は高濃度であっても毒性を持たないため、食品安全のアプリケーションにおいては特に問題になりません。

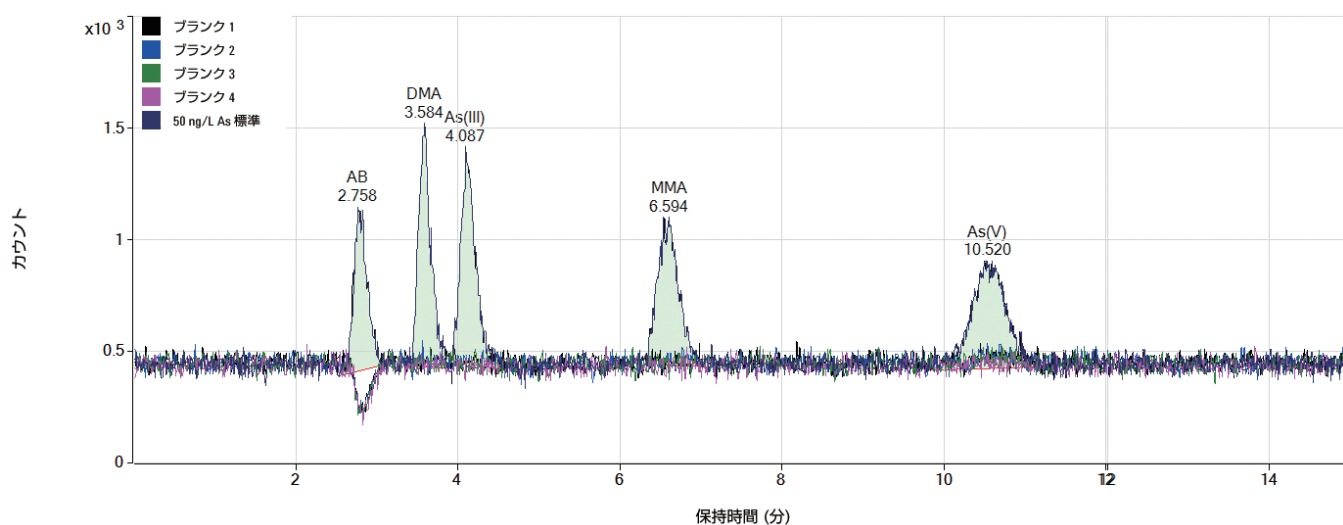


図 1. サンプル処理ブランクを測定し、試薬やフィルタからの As のコンタミネーションが検出できないレベルであることを確認しました。4 種類のブランクと 50 ng/L (ppt) の As 混合標準溶液が重ね書きされています

食品安全のために確実に分離し、高感度で定量しなければならないのが As(III) と As(V) で、これらを合計したものが“総無機ヒ素量”です。

装置条件

バイナリポンプ、オートサンプラ、真空デガッサを搭載した Agilent 1290 Infinity LC システムを Agilent 8800 トリプル四重極 ICP-MS (ICP-QQQ) に接続しました。陰イオン交換ガードカラム (アジレント部品番号: G3154-65002、内径 4.6 mm x 10 mm ポリメタクリレート) と As スペシエーションカラム (アジレント部品番号: G3288-80000、内径 4.6 mm x 250 mm ポリメタクリレート) が常温にて分離に用いられました。HPLC と ICP-MS の測定条件の詳細を表 1 に示します。

As スペシエーションのルーチン分析においては、As (m/z 75) に干渉する多原子分子は ICP-QQQ ではなくクロマトグラフィーで排除します。参考文献 1 にある通り、無機塩化物は As(III) と MMA のピークの間で溶出するため、塩化物から生成された $ArCl^+$ 多原子イオンは As 化合物と干渉しません。

しかし、食品や飲料中の As のスペシエーション分析は、毒性のある無機化合物を低濃度 (ng/L や ppt レベル) で測定することが重要であり、従来の ICP-MS と比べてバックグラウンドが格段に低い Agilent 8800 ICP-QQQ を用いると更なる感度での結果が期待できます。求められる検出下限がそれほど低くなくてもよい場合は、上記のサンプル前処理と HPLC メソッドを用いた Agilent 7700 シリーズ ICP-MS でも、感度は約半分になり、検出下限は数十 ng/L (ppt) になりますが、十分良好な結果を得ることができます。

表 1. Agilent 1290 LC と Agilent 8800 トリプル四重極 ICP-MS の測定条件とパラメータ

1290 Infinity LC	
条件	値
カラム	G3154-65002 (ガードカラム)、 G3288-80000、4.6 x 250 mm (分析カラム)
移動相	2.0 mM PBS/0.2 mM EDTA/10 mM CH_3COONa /3.0 mM $NaNO_3$ /2% EtOH pH 11.00 adjusted with NaOH
流量	1.0 mL/min
温度	Ambient
注入量	100 μ L
Agilent 8800 トリプル四重極 ICP-MS	
パラメータ	値
RF 出力	1550 W
キャリアガス流量	1.05 L/min
スプレーチャンバ温度	2 °C
サンプリング深さ	10 mm
引出しレンズ 1	0 V
四重極モード	シングルクワッドモード
セルガスモード	ノーガス

結果と考察

各 As 化学種の検出下限は、標準試料のクロマトグラム上のピーク比較で S/N 比が 3 倍となる濃度としました。表 2 に示した通り、5 種類の As 化学種の検出下限は全て 10 ng/L から 22 ng/L の間でした。図 2 に、S/N と LOD 算出に使用した 500 ng/L As 標準溶液のクロマトグラムが示してあります。良好な感度とピーク分離を得ることができました。

検量線は 10 ng/L~500 ng/L の濃度で調整され、図 3 に示した通り、優れた直線性を得ることができました。

リンゴジュースの測定結果

表 3 に 6 種類のリンゴジュース中の As の定量結果を示し (2 倍希釈は結果に反映されています)、クロマトグラムを図 4 に示します。濃度結果から明らかなように、As のほぼ全てが毒性を持つ無機体でありながら、全てのリンゴジュースサンプル中の総ヒ素量は、USEPA が定める飲料水の上限值 10 µg/L を下回っていることが分かりました。図 4 にあるクロマトグラムはそれぞれの濃度の違いを見やすくするため、全て同じスケールで示しました。

表 2. 3x S/N で算出したアルセノベタイン (AB)、ジメチルアルシリン酸 (DMA)、As(III) (亜ヒ酸)、モノメチルアルソン酸 (MMA)、As(V) (ヒ酸) の検出下限。
* アルセノベタイン (AB) はポイドボリウムとして溶出するため、共存物によっては正確に定量できません。

化合物	保持時間 (分)	高さ	面積	ノイズ	S/N	LOD (ng/L)	ノイズタイプ
AB*	2.823	19584	249584	153	127.99	11.72	Peak-to-peak
DMA	3.602	22117	277103	153	144.54	10.38	Peak-to-peak
As(III)	4.128	18022	265346	153	117.78	12.74	Peak-to-peak
MMA	6.566	14421	299863	153	94.24	15.92	Peak-to-peak
As(V)	10.431	10265	329325	153	67.08	22.36	Peak-to-peak

全時間範囲 EIC(75) : 008CAL.S.d

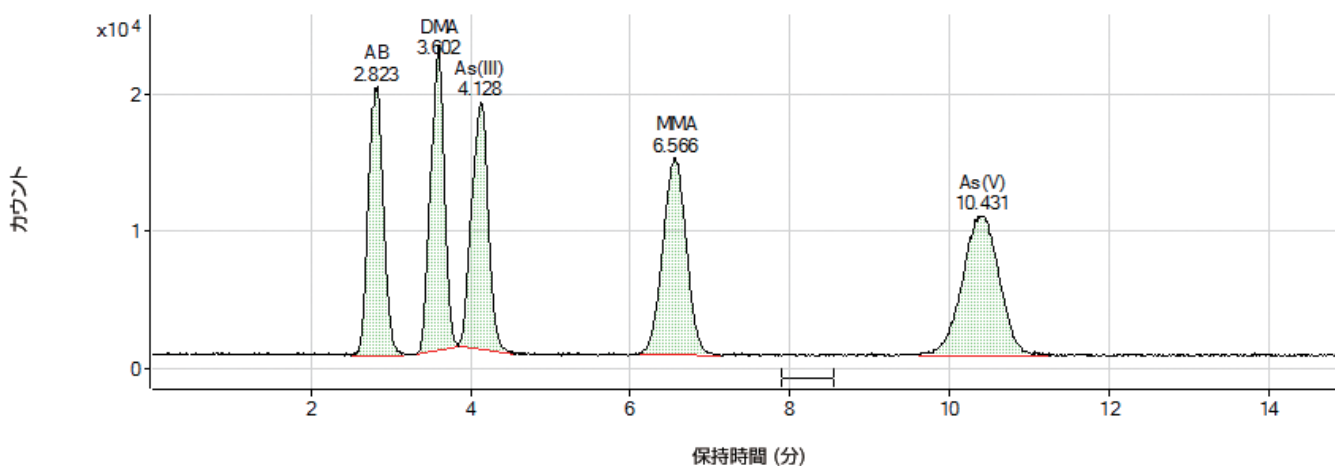


図 2. As 混合標準溶液 (500 ng/L (ppt)) のクロマトグラム。高感度、良好なピーク分離、および S/N と LOD 算出に使われたノイズ領域を得ることができました

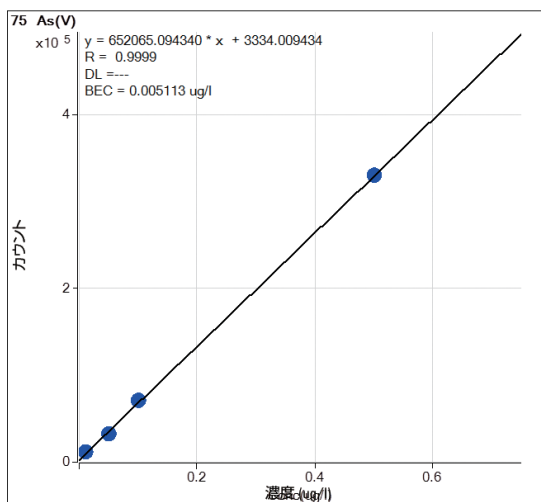
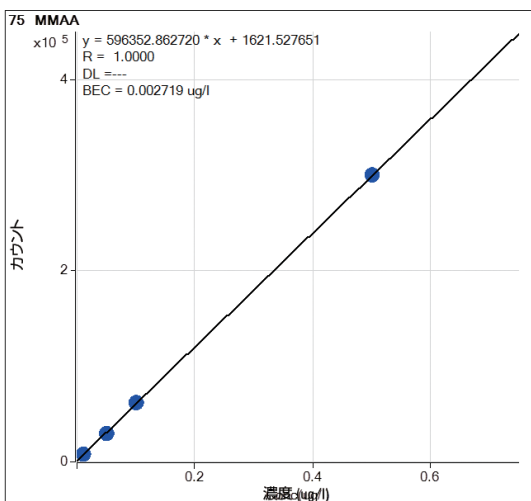
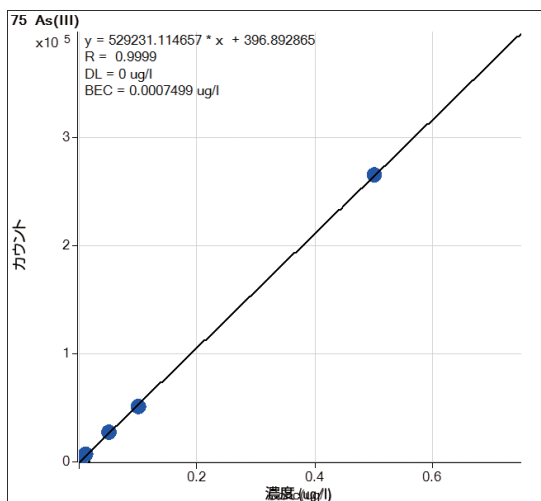
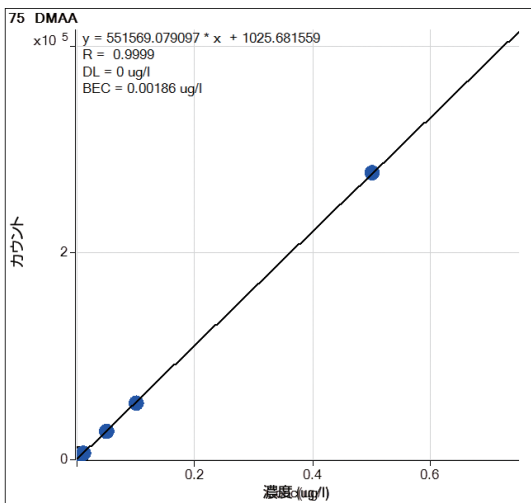
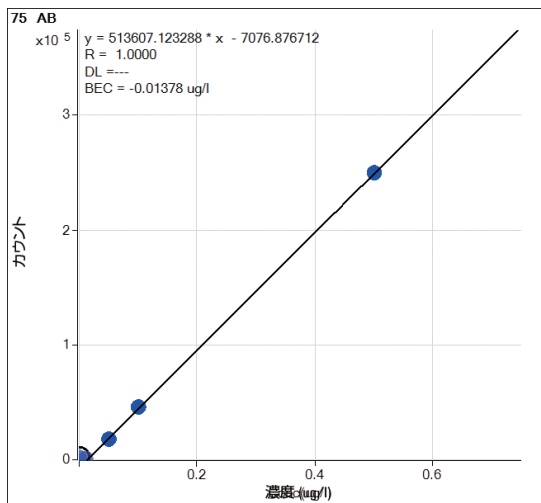


図 3. AB, DMA, As (III), MMA, As (V) の検量線

表 3. LC-ICP-QQQ で測定された 6 種類の市販リンゴジュース中に含まれる As 化学種の定量結果 (µg/L)

サンプル名	希釈倍率	AB	DMA	As(III)	濃度 µg/L			総 As 量
					MMA	As(V)	無機 As	
リンゴジュース 1	2	0.069	0.196	0.704	0.033	0.631	1.335	1.600
リンゴジュース 2	2	0.066	0.037	0.062	0.006	0.008	0.070	0.173
リンゴジュース 3	2	0.063	0.292	0.847	1.633	0.827	1.674	3.662
リンゴジュース 4	2	0.052	0.276	1.014	1.475	1.977	2.991	4.794
リンゴジュース 5	2	0.067	0.225	1.196	0.795	0.724	1.920	3.007
リンゴジュース 6	2	0.043	0.254	1.218	0.005	0.095	1.313	1.610

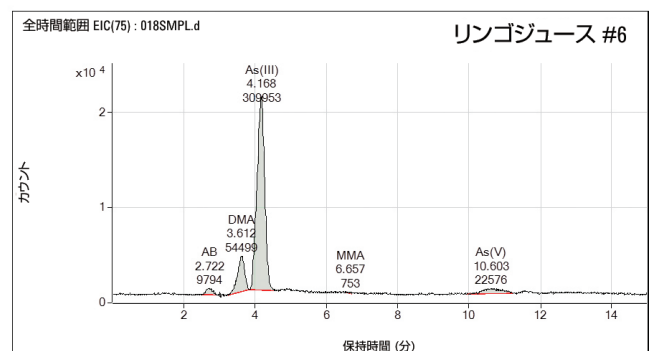
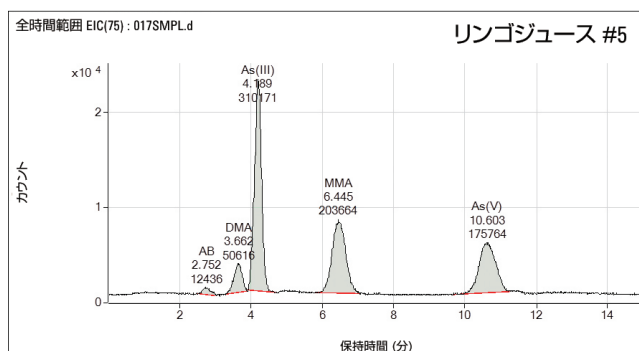
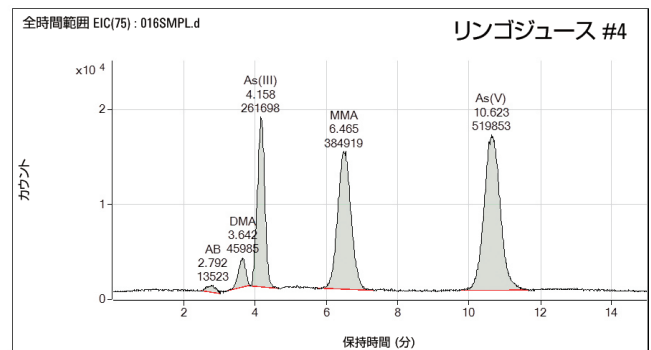
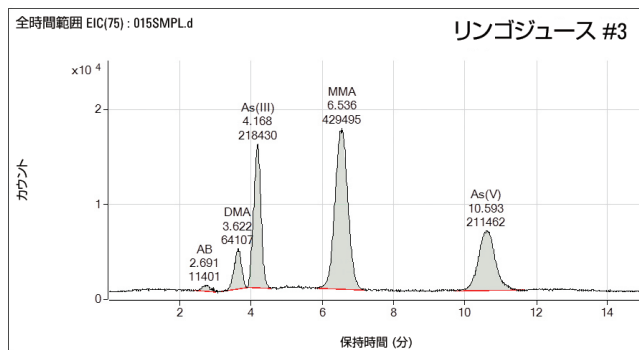
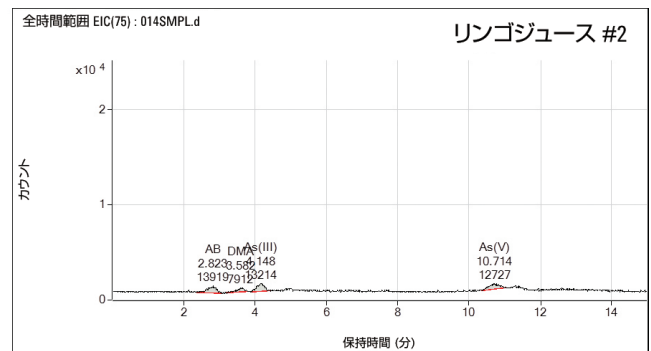
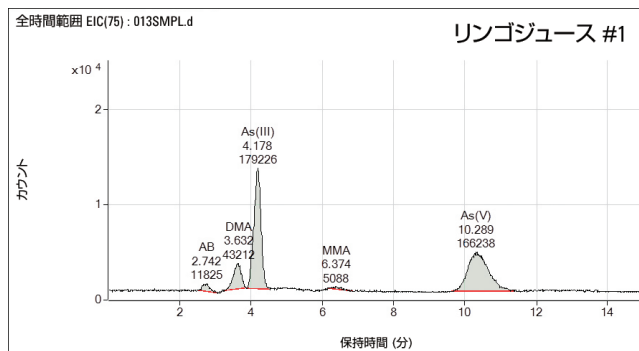


図 4. 6 種類のリンゴジュース中の各 As 化学種のクロマトグラム

全てのリンゴジュースにおいて As が見られたものの、総ヒ素量と各化学種の濃度は様々でした。しかし、総ヒ素量 (全ての As の形態を足し合わせたもの) は全て 5 µg/L 以下で、USEPA の定める飲料水の上限値 (10 µg/L) の半分以下でした。無機 As の総量 (As(III)と As (V) を足し合わせたもの) は、全てのサンプルで 3 µg/L 以下で、6 サンプルのうち 5 サンプルは 2 µg/L 以下でした。

添加回収試験と再現性試験

このメソッドを実サンプルに応用するため、As の標準溶液を用いスパイク添加回収試験を行いました。2 倍に希釈されたリンゴジュース #1 に As の標準溶液 500 ng/L をスパイク添加しました。スパイクされたサンプルは未知サンプルとして繰り返し分析され、計 7 回の注入で定量されました。表 4 に全 As 化学種の保持時間と濃度を示します。7 回全ての測定で、保持時間と濃度とも優れた再現性を得ることができました。全ての As 化学種において保持時間の %RSD は 0.5 % 未満で、濃度の %RSD は 1.6 % 未満でした。7 回のクロマトグラムを重ね書きしたものを図 5 に示します。

表 4. リンゴジュース #1 に 1 µg/L の標準溶液を加えて行われた添加回収試験 (n = 7) の結果

サンプル名	AB		DMA		As(III)		MMA		As(V)	
	保持時間 (分)	濃度 (µg/L)	保持時間 (分)	濃度 (µg/L)	保持時間 (分)	濃度 (µg/L)	保持時間 (分)	濃度 (µg/L)	保持時間 (分)	濃度 (µg/L)
リンゴジュース1 スパイク 1	2.77	0.848	3.62	1.112	4.19	1.606	6.43	0.980	10.62	1.524
リンゴジュース 1 スパイク 2	2.76	0.862	3.61	1.116	4.19	1.632	6.43	0.996	10.63	1.560
リンゴジュース 1 スパイク 3	2.77	0.872	3.61	1.125	4.19	1.621	6.41	1.007	10.62	1.551
リンゴジュース 1 スパイク 4	2.77	0.886	3.61	1.122	4.18	1.632	6.41	1.003	10.63	1.554
リンゴジュース 1 スパイク 5	2.78	0.882	3.61	1.134	4.19	1.643	6.41	1.008	10.65	1.561
リンゴジュース 1 スパイク 6	2.78	0.873	3.61	1.146	4.17	1.637	6.37	1.016	10.68	1.597
リンゴジュース 1 スパイク 7	2.78	0.881	3.60	1.145	4.17	1.651	6.35	1.018	10.69	1.588
平均	2.78	0.872	3.61	1.128	4.18	1.632	6.41	1.004	10.65	1.562
標準偏差	0.0076	0.0133	0.0058	0.0135	0.0096	0.0148	0.0306	0.0130	0.0291	0.0242
%RSD	0.28	1.53	0.16	1.20	0.23	0.91	0.48	1.29	0.27	1.55

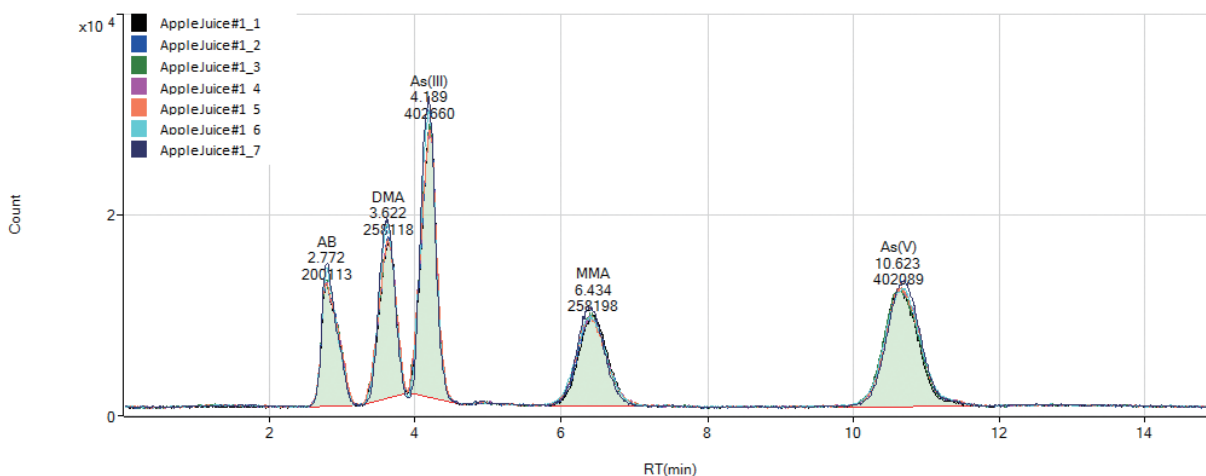


図 5. 500 ng/L As 標準溶液をスパイク添加したリンゴジュース #1 を 7 回重ね書いたクロマトグラム

結論

Agilent 1290 Infinity LC と Agilent 8800 ICP-QQQ を接続し、有毒である As (III) と As (V) を含めた 5 種類の As 化学種を低 $\mu\text{g/L}$ またはサブ $\mu\text{g/L}$ 濃度で定量することができました。容易なフィルタ処理とサンプルの 2 倍希釈のみで全ての As 化学種において検出下限は 10~20 ng/L (ppt) となりました。全リンゴジュースサンプルにおいて As 化学種が定量されましたが、その量は様々でした。今回測定されたサンプルの中の総ヒ素量は全て 5 $\mu\text{g/L}$ 以下でした。無機ヒ素 (As(III) と As(V) の合計) は全 6 サンプルにおいて 3 $\mu\text{g/L}$ 以下で、そのうち 5 サンプルは 2 $\mu\text{g/L}$ 以下でした。

今回の測定で用いたリンゴジュースの測定結果は、飲料水の無機ヒ素の上限値である 10 $\mu\text{g/L}$ を下回ったというアメリカ食品医薬品局 (FDA : Food and Drug Administration) のモニタープログラムの結果を支持する結果になりました。また、今回購入したリンゴジュースは、無機ヒ素の含量による健康被害の恐れはないということが分かりました。

参考文献

1. Tetsushi Sakai and Steve Wilbur, Routine Analysis of Toxic Arsenic Species in Urine Using HPLC with ICP-MS, Agilent publication 5989-5505EN.

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. 2012
Published July 10, 2012
Publication number: 5991-0622JAJP