

# HPLC-ICP-MS による 精米中のヒ素種 5 種の高速測定

## アプリケーションノート

食品安全性

### 著者

Bing Yue  
China National Center For Food Safety Risk  
Assessment, Beijing, China

Juane Song, Ke Xie, Zhao-jun Yun and  
Jian-qiu Mi  
Agilent Technologies, Beijing, China



## はじめに

ヒ素 (As) は、毒性があることで広く知られている元素です。環境や食品中に存在する可能性があることから、厳しい規制が課され、広範囲にわたってモニタリングが行われています。ただし、As の生体毒性はその化学形態によって大きく異なり、総 As の分析よりも As のスペシエーション分析が重要となります。例えば、海藻サンプルが高濃度の As を含有していることがわかっていても、それが主に AsB (アルセノベタイン) の形であれば、海藻を摂取することによる潜在的リスクはありません。これは、AsB に毒性がないからです。As には主に、As(V) (ヒ酸)、MMA (モノメチルアルソン酸)、As(III) (亜ヒ酸)、DMA (ジメチルアルシン酸)、および AsB の 5 種類の化学種があります。そのうち、毒性があるのは、無機態である As(III) と As(V) の 2 種類のみです。無機態の As はヒトに対する発がん性もあるため、特に食品中の濃度を測定することが必要です。米に含まれる As は、米を毎日摂取する国々にとって大きな懸念事項です。イネは土壌および水から As を吸収します。米は成長のために他の植物よりも大量の水を必要とするため、As が蓄積する可能性は高くなります。

このアプリケーションノートでは、Agilent ZORBAX SB-Aq カラム、Agilent 1260 HPLC と Agilent 7900 ICP-MS を組み合わせたシステムを使用して、米に含まれる有毒な As 種を測定する高速メソッドを紹介します。



Agilent Technologies

## 実験

### 使用機器と測定条件

分析には、クォータナリポンプ、オートサンプラ、および真空デガッサからなる Agilent 1260 HPLC システムを Agilent 7900 ICP-MS と組み合わせて使用しました。カラム出口は、PFA チューブで ICP-MS のネブライザに接続しました。全分析を通して、Agilent ZORBAX SB-Aq (部品番号 880975-914、内径 4.6 mm x 250 mm、5  $\mu$ m) 逆相カラムを室温で維持しました。移動相には、20 mM のクエン酸と 5 mM のヘキサンスルホン酸ナトリウムの混合液を水酸化ナトリウムで pH = 4.3 に調整したものを使用しました。注入量は、5  $\mu$ L および 100  $\mu$ L の 2 種類について評価しました。HPLC と ICP-MS のパラメータを表 1 に示します。

オクタポールリアクションシステム (ORS<sup>4</sup>) コリジョンリアクションセル (CRC) を搭載した Agilent 7900 ICP-MS は、複数の干渉物の存在下でも高感度の特異的 As 分析が可能です。一部の規制ガイドランスでは、胃の状態をシミュレートするために、食品サンプルを HCl で抽出することが求められています。ところが、この処理によって ArCl および CaCl 由来の多原子イオンが形成され、As 唯一の同位体に  $m/z$  75 でスペクトル干渉する可能性があります。7900 ICP-MS ORS<sup>4</sup> をヘリウムモードで動作させることで、As に干渉するこれらのマトリックス由来の多原子を効果的に除去することができます。

表 1. Agilent 1260 HPLC および 7900 ICP-MS の使用条件

ICP-MS パラメータ	
RF 出力	1550 W
サンプリング深さ	8 mm
キャリアガス	0.6 L/min
メイクアップガス	0.5 L/min
セルガス	He 4 mL/min
KED	3 V
モニターした同位体	<sup>75</sup> As、 <sup>35</sup> Cl
ドウェルタイム	1.0 s/ <sup>75</sup> As、0.1 s/ <sup>35</sup> Cl
HPLC パラメータ	
移動相	イソクラティック、20 mM の C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> と 5 mM の C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NaO <sub>3</sub> S の混合液を NaOH で pH 4.3 に調整
カラム	Agilent ZORBAX SB-Aq
流量	1.2 mL/min
温度	室温
注入量	5 $\mu$ L または 100 $\mu$ L
分析時間	4 分

### 化学薬品および試薬

As(V)、MMA、As(III)、DMA、および AsB の標準原液は、NIMC (中国計量科学研究院、中国北京) から購入しました。高純度のクエン酸 (純度 99.5 % 以上)、ヘキサンスルホン酸ナトリウム (純度 98 % 以上)、および水酸化ナトリウム (純度 99.99 % 以上) は、Sigma Aldrich Chemicals 社 (英国) から購入しました。サンプル前処理には、超高純度 HNO<sub>3</sub> (Sigma Aldrich 社、英国) を使用しました。

### サンプル前処理

精米サンプルは、中国の江蘇省、福建省、遼寧省、重慶市、および江西省のさまざまな場所から入手しました。

精米サンプルを圧砕し、30 メッシュのストレーナでふるいにかかけ、米粉にしました。米粉サンプル 1.00 g を計量し、ポリプロピレン製遠心分離チューブ (50 mL) に入れました。0.15 M の HNO<sub>3</sub> 15 mL を加え、サンプルを 30 秒間ボルテックスミキサーで攪拌しました。チューブをキャップで密閉し、室温で一晩放置した後、90 °C のオープン内で 2.5 時間放置しました。その間、30 分おきに 30 秒間攪拌しました。抽出の完了後、サンプルを 4 °C の冷蔵庫で冷却しました。冷却した米粉懸濁液を 8000 rpm で 15 分間遠心分離し、上澄みを 0.22  $\mu$ m の硫化ポリエーテル (PES) フィルタでろ過しました。化学種間の相互変換を最小限に抑えるために、ろ液は 4 °C で保管し、24 時間以内に分析しました。

## 結果と考察

### 分離と定量

5 種類の As 種を含むキャリブレーション標準液を異なる濃度 (1 ppb、5 ppb、10 ppb、50 ppb、100 ppb、および 200 ppb) で調製し、分析しました。10 ppb のキャリブレーション標準のクロマトグラム (注入量 5  $\mu$ L) では、5 種類の As 種が 4 分以内に良好に分離しました (図 1)。キャリブレーション標準の分析結果をもとに、As 種の検量線を作成しました。これを図 2 に示します。

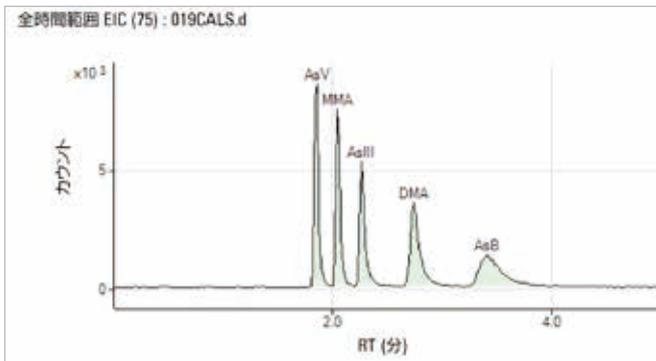


図 1. 10 ppb (As 元素としての濃度) の As 種混合標準液のクロマトグラム (注入量 5  $\mu$ L)

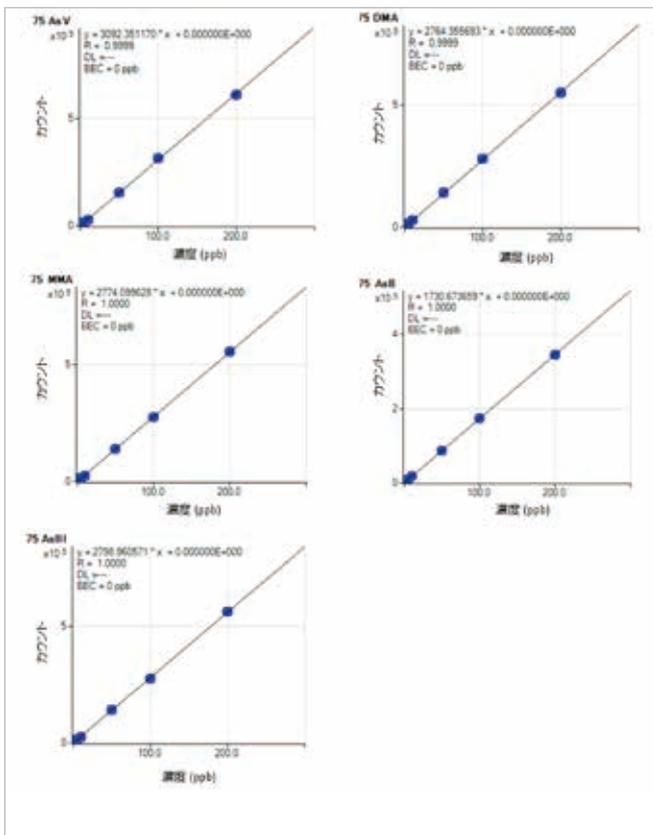


図 2. As(V)、MMA、As(III)、DMA、および AsB の検量線。良好な直線性を示しています。

### 検出下限

各 As 種の検出下限 (DL) を、標準クロマトグラムのピーク間ベースラインノイズ (S/N) の 3 倍の信号強度に相当する濃度として計算しました。結果を表 2 にまとめています。表に示すとおり、5 種類の As の DL は、注入量が 5  $\mu$ L の場合は 0.106 ~ 0.667 ppb、注入量が 100  $\mu$ L の場合は 0.010 ~ 0.042 ppb でした。

表 2. 注入量 5  $\mu$ L および 100  $\mu$ L の場合の As(V)、MMA、As(III)、DMA、および AsB の検出下限 (ppb)

注入量 ( $\mu$ L)	As(V)	MMA	As(III)	DMA	AsB
5	0.106	0.121	0.187	0.267	0.667
100	0.010	0.012	0.025	0.028	0.042

図 3 は、50 ppt の As 種標準混合液のクロマトグラムです (注入量 100  $\mu$ L)。この結果から、このメソッドが超微量分析に対応できることがわかります。

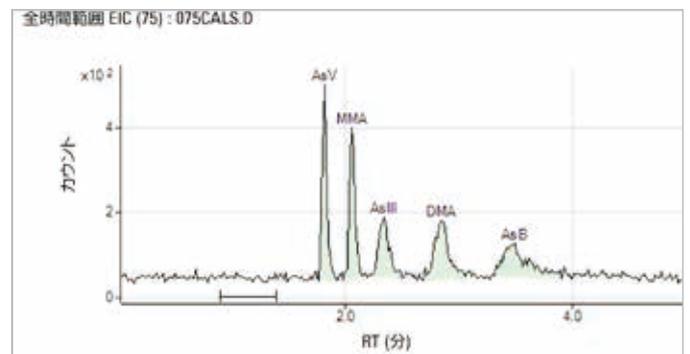


図 3. 50 ppt の As 種混合液のクロマトグラム (注入量 100  $\mu$ L)

### 認証標準物質 (CRM) の分析

このメソッドを使用して、2 種類の米粉 CRM (NIST 1568a および NIST 1568b) を分析しました。NIST 1568a で認証されているのは、総 As 濃度 (290  $\pm$  30 ppb) のみですが、この CRM の詳細な特性解析結果は文献で参照できます。前述のサンプル前処理方法に従って 2 種類の CRM を抽出し、5 種類の As 種を分析しました。

表 3 および表 4 に、2 種類の CRM の無機 As 種、MMA、DMA、および総 As の濃度と、認証値または文献の報告値をまとめます。今回の実験では、総 As 濃度は、無機 As、MMA、DMA、および AsB の濃度を合計することにより求めました。この結果からわかるように、NIST 1568b 中の無機 As (iAs) および両方の CRM の総 As の定量結果は、標準偏差内で認証値と良好に一致しています。また、各 As 種の定量結果は、文献の報告値にも良好に一致しています [1-4]。

表 3. NIST 1568b 米粉中の As 種の定量結果<sup>a</sup>

	As(V) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	MMA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	As(III) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	DMA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	無機 As <sup>b</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	総 As ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
今回の実験	62.0 $\pm$ 5.1	10.6 $\pm$ 1.3	36.8 $\pm$ 5.8	179 $\pm$ 7	98.8 $\pm$ 3.6	288.4
認証値		11.6 $\pm$ 3.5		180 $\pm$ 12	92 $\pm$ 10	285 $\pm$ 14

<sup>a</sup> 値は、10 回の注入による定量結果を「平均  $\pm$  標準偏差」の形で記載しています。<sup>b</sup> 無機 As: As(III) と As(V) の合計。

表 4. 今回の実験で得られた NIST 1568a 米粉中の As 種の定量結果と文献値の比較<sup>a</sup>。NIST 1568a の総 As 濃度の認証値は 290  $\pm$  30 ppb です。

	As(V) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	MMA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	As(III) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	DMA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	無機 As <sup>b</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	総 As ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
文献 [1]	44 $\pm$ 2	12 $\pm$ 0.8	52 $\pm$ 1	173 $\pm$ 2	100	281 $\pm$ 2
文献 [2]	50.3 $\pm$ 2.9	14.9 $\pm$ 3.9	63.4 $\pm$ 3.5	144 $\pm$ 4.5	113.7	272.8 $\pm$ 9.9
文献 [3]	53.7 $\pm$ 3.3	14.8 $\pm$ 1.8	54.7 $\pm$ 1.4	165 $\pm$ 8	108.4	288.2
文献 [4]		13.6 $\pm$ 2.5		168.0 $\pm$ 2.2	104.3 $\pm$ 4.4	286.1 $\pm$ 3.8
今回の実験	64 $\pm$ 5	14 $\pm$ 2	57 $\pm$ 4	140 $\pm$ 4	121	275 $\pm$ 4

<sup>a</sup> 値は、10 回の注入による定量結果を「平均  $\pm$  標準偏差」の形で記載しています。<sup>b</sup> 無機 As: As(III) と As(V) の合計。

### サンプル添加回収率

サンプル添加回収率を 5 種類の As 種について調べました。As(V)、MMA、As(III)、DMA、および AsB の混合物を 3 つの米サンプル抽出液に 1 ppb、5 ppb、および 10 ppb で添加しました。それぞれの添加濃度について 3 回の繰り返し分析用のサンプルを調製しました (添加 1、2、および 3)。表 5 に示すように、各添加溶液では、すべての濃度ですべての化学種について回収率が 85 ~ 110 % という良好な結果が得られました。

表 5. サンプル添加回収率の結果 (注入量 5  $\mu\text{L}$ )

サンプル名	添加濃度	As(V)		MMA		As(III)		DMA		AsB	
		濃度 (ppb)	回収率 (%)								
<b>米 # 1</b>		<b>0.48</b>	–	<b>N.D.</b>	–	<b>4.60</b>	–	<b>0.48</b>	–	<b>N.D.</b>	–
添加 1	1 ppb	1.38	89.2 %	1.02	101.5 %	5.65	105.6 %	1.54	106.1 %	1.03	103.2 %
添加 2		1.43	94.5 %	0.96	96.2 %	5.51	90.8 %	1.42	93.9 %	1.07	106.5 %
添加 3		1.47	98.1 %	0.95	94.3 %	5.52	92.2 %	1.45	97.4 %	0.98	98.4 %
<b>米 # 2</b>		<b>1.14</b>	–	<b>N.D.</b>	–	<b>5.82</b>	–	<b>1.32</b>	–	<b>N.D.</b>	–
添加 1	5 ppb	5.52	87.6 %	4.96	99.2 %	10.98	103.2 %	6.23	98.3 %	4.82	96.3 %
添加 2		5.65	90.1 %	4.77	95.3 %	10.88	101.3 %	6.45	102.6 %	4.97	99.4 %
添加 3		5.77	92.5 %	4.34	86.7 %	11.35	110.6 %	6.62	106.1 %	5.13	102. %
<b>米 # 3</b>		<b>0.28</b>	–	<b>N.D.</b>	–	<b>3.44</b>	–	<b>0.73</b>	–	<b>N.D.</b>	–
添加 1	10 ppb	9.65	93.7 %	9.68	96.8 %	13.35	99.1 %	9.72	89.9 %	8.91	89.1 %
添加 2		9.89	96.1 %	10.08	100.8 %	12.97	95.3 %	10.29	95.6 %	9.54	95.4 %
添加 3		9.53	92.5 %	10.62	106.2 %	13.10	96.6 %	10.65	99.2 %	10.48	104.8 %

### 精度

このメソッドの精度を、1 つの米サンプルを 10 回注入して繰り返し分析することにより調べました。表 6 に、全 As 種の濃度の結果を示します。10 回の分析において優れた再現性が示されています。すべての As 種で RSD (相対標準偏差) が 4 % を下回り、無機 As については 2 % 未満でした。

表 6. 米 # 4 の再現性の結果 (n = 10, 注入量 5  $\mu\text{L}$ )

サンプル	As(V) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	MMA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	As(III) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	DMA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	AsB ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	無機 As ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
米 # 4-1	56.10	N.D.	107.32	22.29	N.D.	163.42
米 # 4-2	55.23	N.D.	110.39	24.74	N.D.	165.62
米 # 4-3	56.97	N.D.	107.30	23.10	N.D.	164.27
米 # 4-4	57.68	N.D.	108.51	24.19	N.D.	166.18
米 # 4-5	57.16	N.D.	108.46	23.64	N.D.	165.62
米 # 4-6	56.10	N.D.	108.52	24.82	N.D.	164.62
米 # 4-7	56.43	N.D.	108.89	23.96	N.D.	165.32
米 # 4-8	57.27	N.D.	107.90	22.37	N.D.	165.17
米 # 4-9	56.18	N.D.	109.56	22.70	N.D.	165.73
米 # 4-10	56.71	N.D.	108.76	23.35	N.D.	165.47
平均	56.58	–	108.56	23.52	–	165.14
RSD (%)	1.3 %	–	0.9 %	3.9 %	–	0.5 %

## 市販米サンプルの分析

20 種類の市販米サンプル中の As 濃度を測定しました。その結果を表 7 にまとめます。結果からわかるように、20 種類すべての米サンプルで As(V)、As(III)、および DMA が検出されました。無機 As と DMA の濃度は米サンプルによって大きく異なりますが、これはイネの生育環境の As 濃度が反映されたものと考えられます。毒性のある無機 As の濃度はサンプルによってまちまちですが、どの米サンプルでも国際食品規格委員会勧告の上限濃度 0.2 mg/kg を下回っています。

表 7. 20 種類の米サンプル中の As 種全 5 種の定量結果 (µg/kg)

サンプル名	As(V)	MMA	As(III)	DMA	AsB	無機ヒ素
米 # 1	7.27	N.D.	68.97	7.16	N.D.	76.24
米 # 2	17.15	N.D.	87.23	19.77	N.D.	104.38
米 # 3	4.26	N.D.	51.57	10.93	N.D.	55.83
米 # 4	56.10	N.D.	107.32	22.29	N.D.	163.42
米 # 5	17.31	N.D.	147.2	26.38	N.D.	164.73
米 # 6	12.52	N.D.	75.82	8.79	N.D.	88.35
米 # 7	7.14	N.D.	53.84	2.67	N.D.	68.94
米 # 8	14.4	N.D.	106.14	27.27	N.D.	120.54
米 # 9	14.49	N.D.	72.24	29.51	N.D.	86.73
米 # 10	13.73	N.D.	101.68	39.41	N.D.	115.41
米 # 11	20.50	N.D.	87.04	285.21	N.D.	107.55
米 # 12	22.78	N.D.	70.94	160.77	N.D.	93.72
米 # 13	23.74	N.D.	122.19	34.53	N.D.	145.94
米 # 14	13.85	N.D.	59.79	361.82	N.D.	73.64
米 # 15	16.38	N.D.	91.34	83.42	N.D.	125.38
米 # 16	18.48	N.D.	110.58	32.25	N.D.	129.06
米 # 17	10.83	N.D.	61.56	6.69	N.D.	72.39
米 # 18	16.96	N.D.	105.14	209.49	N.D.	122.1
米 # 19	36.04	N.D.	97.17	176.12	N.D.	133.22
米 # 20	16.35	N.D.	74.55	587.49	N.D.	90.9

## 結論

Agilent 1260 Infinity LC と Agilent 7900 ICP-MS を組み合わせたシステムを使用して、精米に含まれる 5 種類の As 種を分離しました。このメソッドにより、毒物学的に関連性のある無機態 As(III) および As(V) を 4 分以内にすばやく、また優れた感度、真度、および精度で測定することができました。As に干渉する可能性のある ArCl<sup>+</sup> などの多原子イオンは、ORS<sup>4</sup> セルをヘリウムモードで動作させることにより除去できました。

また、20 種類すべての米サンプルで、無機 As および DMA がさまざまな濃度で検出されました。ただし、その濃度が、国際食品規格委員会勧告の上限値 0.2 mg/kg を超えているサンプルはありませんでした。

今回の実験で検証した手法は、米およびその他食品サンプルに微量濃度で含まれる As(V)、MMA、As(III)、DMA、および AsB の高速測定に適しています。

## 参考文献

1. Narukawa T., Inagaki K., Kuroiwa T., Chiba K, 'The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC-ICP-MS' [J], *Talanta* 77, 2008, 427-432
2. Huang J H, Ilgen G, 'Blank value, adsorption, preconcentration, and preservation for arsenic speciation of the environmental water samples' [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 512:1-10.
3. Caruso J.A, B' Hymer C, Heitkemper D.T., 'An evaluation of extraction techniques for arsenic species from freeze-dried apple sample' [J]. *Analyst*, 2001, 126: 136-140.
4. Toni Llorente-Mirandes et al., 'A fully validated method for the determination of arsenic species in rice and infant cereal products', *Pure Appl. Chem.*, 2012, vol. 84, No. 2, 225-238

**[www.agilent.com/chem/jp](http://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損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様などは予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2015

Published July 15, 2015

5991-5933JAJP



**Agilent Technologies**