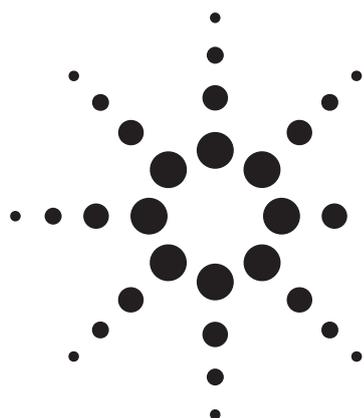


# HPLC-ICP-MS を用いた有機と無機セレン種の測定



アプリケーション

環境

## 著者

Maité Bueno, Florence Pannier, and Martine Potin-Gautier  
Laboratoire de Chimie Analytique Bio Inorganique et Environnement  
Université de Pau et des Pays de l'Adour, 64000 Pau  
France

Jérôme Darrouzes  
Agilent Technologies  
France

## 要約

アイソクラティック高速液体クロマトグラフ (HPLC) とコロリジョン/リアクションセルを搭載した誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) を組み合わせて、天然水サンプル中の有機および無機セレン種の同時分析手法の検討を行いました。全セレン分析とスペシエーション分析 (化学形態別分析) で検出されたセレン濃度は優れた一致度を示しました。HPLC-ICP-MS の組み合わせは簡単に自動化できるため、堅牢なメソッドを環境サンプルや栄養サンプル中のセレン種の日常的なモニタリングに適用できます。

## 緒言

過去 20 年間に、元素が存在する可能性のあるさまざまな化学形態の測定、つまりスペシエーション分析 (化学形態別分析) への関心が高まってきました。実際には、元素のトータル濃度の知識だけでは、人の健康や環境への影響を評価するには十分ではありません。そのような元素の中で、セレンへの関心が高まっています。セレンはその効用と毒性の間の濃度範囲が狭いため、生態毒性の観点で非常に重要です。セレン化合物は、人間の活動 (工業と農業での使用) と自然作用 (鉱物の風化、土壌の浸食、火山活動) の結果として、環境中に広く分布しています。水中の濃度は、系によって 2 ng/L ~ 1,900 µg/L で変わる可能性があります [1]。セレンの自然のサイクルは、4 つの酸化状態 (-II、セレナイド; 0、元素セレン; +IV、セレナイト; +VI、セレン酸) で、さまざまな無機と有機化合物中に存在します。有機結合 Se (-II) 化合物は、他の種と比較して毒性が低く、さまざまな解毒化経路から生じる、セレノアミノ酸と揮発性形態 (ジメチルセレナイドとジメチルジセレナイド) を含みます。セレンの形態と毒性は表 1 のとおりです。



Agilent Technologies

表 1. 選択したセレン化合物とその毒性

化合物	化学式	50% 致死量 LD-50*	参照
ジメチルセレナイド (-II)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Se	1600 mg/kg (Int.)	[2]
水素化セレン (-II)	H <sub>2</sub> Se	0.02 mg/L (Resp.)	[3]
トリメチルセレンウム (-II)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Se <sup>+</sup>	49 mg/kg (Int.)	[3]
セレノシスチン (-I)	[HO <sub>2</sub> CCH(NH <sub>2</sub> )CH <sub>2</sub> Se] <sub>2</sub>	35.8 mg/kg (Or.)	[4]
セレノメチオニン (-II)	CH <sub>3</sub> Se(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH(NH <sub>2</sub> )CO <sub>2</sub> H	4.3 mg/kg (Int.)	[3]
セレナイト (+IV)	SeO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	3.5 mg/kg (Int.)	[5]
セレン酸 (+VI)	SeO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	5.8 mg/kg (Int.)	[5]

\* 腹腔内 (Int.)、口腔内 (Or.)、または呼吸器 (Resp.) からの吸収によるマウスやラットでの致死量

さまざまな環境要因のサンプル中のセレンやその化学種の測定用には、多くの分析手法が存在します。セレン濃度に応じて、既存のメソッドを以下の 3 つのグループに分類できます。

- 全セレン
- セレナイト種
- セレンの無機と有機形態を含む種

さまざまな酸化還元反応が、セレナイト種の測定によく利用されます。しかし、一連の試薬添加と前処理操作においては、元素の損失や汚染の可能性が増します。サンプル前処理中にセレナイトからセレン酸への逆酸化が起こり、スペシエーション結果が歪められる可能性もあります。さらに、セレナイトとセレン酸は 2 つの別の分析で区別され、同定されないままに残る個々の有機セレン種には当てはまらないことがあります。したがって、1 回の分析でさまざまなセレン種を同時に分離と定量できるメソッドが好まれ、より広く普及しつつあります。

このアプリケーションノートでは、高速液体クロマトグラフ (HPLC) と誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) を組み合わせたシステムによる、天然水サンプル中のセレンのスペシエーション分析について紹介します。

## 装置編成

オクタポールリアクションシステム (OCR) セルを搭載した Agilent 7500ce ICP-MS を使用しました (操作条件は表 2 を参照)。資料導入系は、同軸ネブライザ (Meinhard Associates、米国カルフォルニア州) と 2 °C に冷却された Scott ダブルパススプレーチャンバーから構成されています。

ニッケルサンブラとスキマーコーンを使用しました。クロマトグラフ分離は、オートサンブラと可変容量サンプルループを搭載した、Agilent 1200 シリーズ HPLC ポンプを用いて行いました。分析カラムは、Hamilton PRPX-100、粒径 10 μm、長さ 25 cm × 内径 (id) 4.1 mm です。セレノシスチン (SeCyst)、セレノメチオニン (SeMet)、セレナイト (SeIV)、セレン酸 (SeVI) のクロマトグラフ分離は Ge らの研究により [6]、pH 5.2 に調整したクエン酸アンモニウム緩衝液 5 mmol/L を用い

表 2. Agilent 7500ce ORS ICP-MS の装置条件

パラメータ	値
RF 出力	1590 W
Ar プラズマガス流量	15.0 L/min
Ar 補助ガス流量	0.86 L/min
Ar ネブライザガス流量	1 ~ 1.1 L/min
スプレーチャンバー温度	2 °C
スペシエーション分析のための同位体あたりの積分時間	400 ms
モニタリングされる m/z 比	77/82
元素分析のための同位体あたりの積分時間	100 ms

ました。注入量は 100 μL で固定しました。感度を向上させるために、メタノール (2% v/v) が移動相に追加しました [7]。移動相は、定組成の 1 mL/min で送液しました。HPLC-ICP-MS インタフェースは、ポリエーテルエーテルケトン (PEEK) チューブです。

## 多原子イオンによる干渉の除去

ICP-MS はその高い感度と選択性により、微量元素分析に最適な検出器です。これは、全セレン全体とスペシエーション分析に最も頻繁に使用される検出システムでもあります。それでもなお、天然水中のセレン測定に取り組む場合、従来型の ICP-MS (コリジョン/リアクションセルシステムを用いない四重極フィルタ) で得られるセレンの検出下限は十分ではありません。ICP-MS により Se を測定する上での問題は、主に、アルゴン (15.75 eV) と比較して高い第 1 イオン化電位 (9.75 eV) によるもので、結果として、Ar プラズマ中でのイオン化が低くなります (約 33% [8])。また、アルゴンに起因する多原子イオンの干渉、特に <sup>40</sup>Ar<sup>40</sup>Ar<sup>+</sup> と <sup>40</sup>Ar<sup>38</sup>Ar<sup>+</sup> 二量体が、最も存在比の高い <sup>80</sup>Se (存在比 49.6%) と <sup>78</sup>Se (存在比 23.8%) の測定を妨げます。したがって、一般的には、干渉が少なく、存在比の低い <sup>82</sup>Se (存在比 9.2%) がモニタリングされることとなります。アルゴンに起因する多原子イオンの干渉問題は、コリジョン/リアクションセル (CRC) を搭載した ICP-MS システムを用いて解決できます。Agilent 7500 ce の ORS セルを用いることで、全

セレンとスペシエーション分析の検出下限で 10 ~ 20 倍の向上が観察されました。スペシエーション分析検出下限は、<sup>80</sup>Se のモニタリングに基づいて 15 ng/L 以下です (表 3 参照)。7500ce を <sup>80</sup>Se に対して最適化することで、<sup>78</sup>Se よりも <sup>80</sup>Se で良好な検出下限が達成されました。

CRC 技術の使用により、アルゴン起因による干渉の効率的な除去が可能になり、結果として、最も存在比の高い <sup>80</sup>Se のモニタリングを可能にすることで、セレンに対する ICP-MS 検出能力が向上します。しかし、場合によっては、リアクションセル内で生成する副生成物の干渉によりそのような向上は軽減されます。実際、水素やガスに含まれる不純物は、臭素、セレン、ヒ素などの元素と水素化物を形成する恐れがあります [9 ~ 11]。そのため、天然水の場合のように臭素を含むサンプルでは、臭化水素による <sup>80</sup>Se と <sup>82</sup>Se への干渉があります。そのため、誤った解釈を防ぎ、補正式の必要性を軽減するために、<sup>78</sup>Se をモニタリングする必要があります。

表 3. ORS 操作条件の最適化

機器		Agilent 7500ce	
セルガス		5.5 mL/min H <sub>2</sub>	0.5 mL/min He*
元素分析			
		<sup>78</sup> Se	<sup>80</sup> Se
検出下限 (ng/L)		6	4
再現性 (%)		2	2
HPLC 連結			
		<sup>78</sup> Se	<sup>80</sup> Se
検出下限 (ng/L)		14-30	7-15
再現性 (%)		2	2

\* He の追加はオプションです。He なしに同様の検出下限を達成可能です。

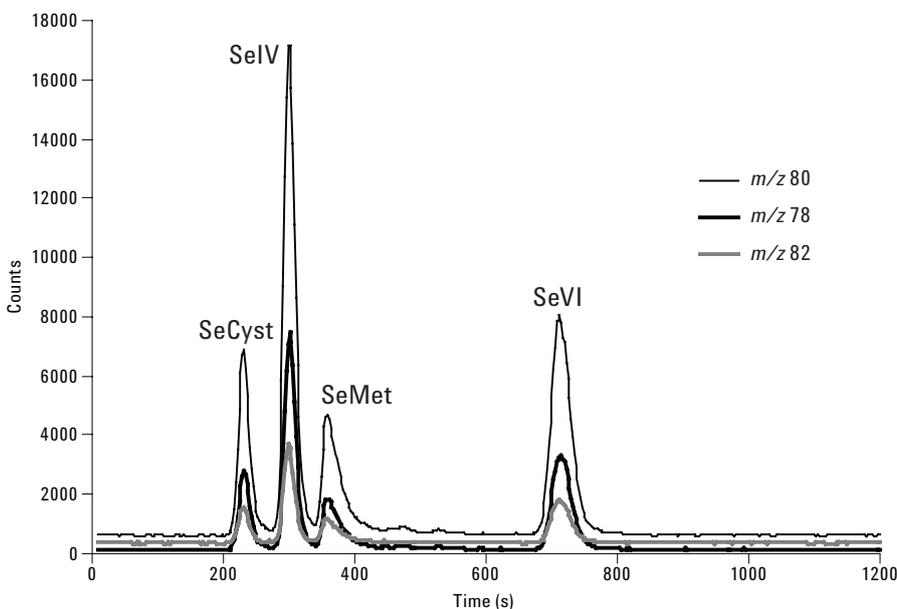


図 1. 標準試料のクロマトグラム、各 1 µg(Se)/L、100 µL 注入、Hamilton PRP X-100 カラム、移動相としてクエン酸緩衝液 pH 5.2 と 2% メタノール

ミネラルウォーターや湧き水中セレンの定量結果を表 4 に示します。(ICP-MS 操作条件は表 3 に示します。) 公認人工雨水 (Natural Research Institute、[カナダ、オンタリオ] の TM-Rain 95 ) に対する結果も示します。補正式を用いず、<sup>78</sup>Se を測定することで全セレンとしました。

## 実験

図 1 に、HPLC-ICP-MS を用いて得られた各 1 µg (Se)/L 標準試料のクロマトグラムを示します。メソッドは、先程ミネラルウォーターと湧き水中の全セレンを分析したときのものを適用しました。セレンの化学種別濃度の結果を、全セレンのデータと併せて表 4 に示します。

全セレン分析とスペシエーション分析で検出された濃度は完全に一致し、このメソッドの天然水サンプルへの適合性を示しています。*m/z* 80 に臭化水素干渉が存在しますが、セレン種と重なることなく、クロマトグラフ分離されています。水サンプル「C」のクロマトグラム (図 2) は、臭素がセレン酸ピークの後に溶出することを示しています。

セレン酸は含酸素水中で検出される頻度が高く、市販の水 A ~ D で確認されました。セレナイトは、全セレン含有量に関して唯一認定されている TM-Rain 95 水で同定されました。市販されていない地下水である水「E」だけが、無機セレンとセレン酸種の両方を含んでいました (図 3 参照)。

表 4. さまざまな天然水中セレンの定量結果 [単位: ng(Se)/L]

天然水	元素分析		HPLC 連結		<sup>80</sup> Se	
	<sup>78</sup> Se	<sup>78</sup> Se	SeIV	SeVI	SeIV	SeVI
TM-Rain 95	622 ± 19*		629 ± 7	< DL	615 ± 8	< DL
A	67 ± 1		< DL	69 ± 2	< DL	72 ± 6
B	142 ± 24		< DL	140 ± 9	< DL	143 ± 4
C	240 ± 20		< DL	232 ± 13	< DL	267 ± 13
D	467 ± 17		< DL	475 ± 4	< DL	492 ± 5
E	1890 ± 160		55 ± 2	1840 ± 30	57 ± 6	1920 ± 20

\* 標準値 740 ± 290 ng(Se)/L

## 結論

必須元素と毒性元素の両方の特性を有するため、近年ではセレンスペシエーションへの関心が高まっています。しかし、有機と無機の形態を含むセレンの完全なスペシエーションは、まだ大きな課題を抱えています。天然水中のセレンのスペシエーション調査は Se 含有量が低濃度のため、まさにその例だといえます。コリジョン/リア

クションセルを搭載した ICP-MS とアイソクラティック HPLC を組み合わせた複合技術により、有機および無機のセレン種の迅速で正確な同時分析が可能になります。さらに、HPLC-ICP-MS の組み合わせは容易に自動化できるため、環境サンプルと栄養サンプル中のセレン種濃度をモニタリングするための堅牢なルーチンメソッドと捉えることができます。

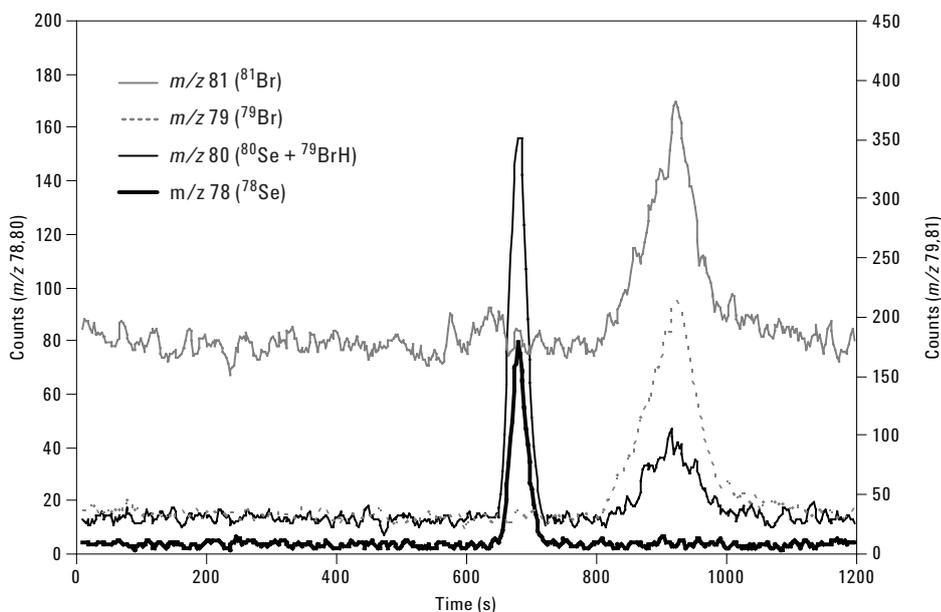


図 2. 天然水「C」のクロマトグラム。副生成物の臭化水素はセレン酸ピークの後に溶出しています

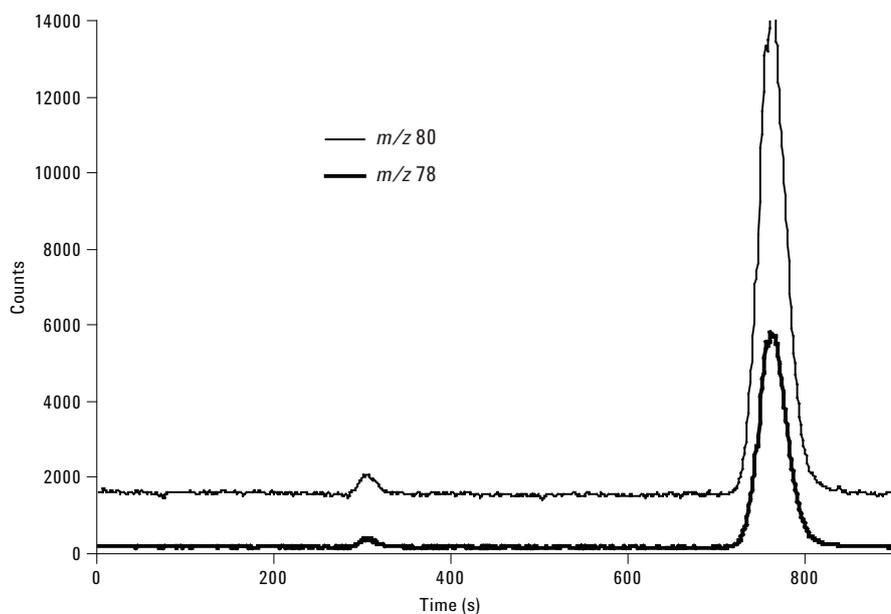


図3. 天然水「E」のクロマトグラム、両方の無機種を含む唯一のサンプル。最初のピークは SeIV、2 番目のピークは SeVI。

## 参考文献

1. J. E. Conde and M. Sanz Alaejos, *Chem. Rev.* 97 (1997) 1979.
2. M. A. Al Bayati, O. G. Raabe, and S. V. Teague, *J. Toxicol. Environ. Health* 37 (1992) 549.
3. C. G. Wilber, *Clin. Toxicol.* 17 (1980) 171.
4. Y. Sayato, T. Hasegawa, S. Taniguchi, H. Maeda, K. Ozaki, I. Narama, K. Nakamuro, *Eisei Kagaku* 39 (1993) 289.
5. World Health Organization (W.H.O.) (1987) Environmental health criteria 58 : selenium.
6. H. Ge, X. J. Cai, J. F. Tyson, P. C. Uden, E. R. Denoyer, and E. Block, *Anal. Commun.* 33 (1996) 279.
7. E. H. Larsen and S. Stürup, *J. Anal. At. Spectrom* 9 (1994) 1099.
8. A. R. Date and A. R. Gray (Eds), "Applications of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry," Blackie & Son, 1989.
9. L. Hinojosa-Reyes, J. M. Marchante-Gayon, J. L. Garcia-Alonso, and A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom*, 18 (2003) 11.

10. D. Wallschlager and J. London, *J. Anal. At. Spectrom*, 19 (2004) 1119

11. J. Darrouzes, M. Bueno, G. Lespes, and M. Potin-Gautier, *J. Anal. At. Spectrom*, 20 (2005) 88.

## 詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト [www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

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。また、本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なく変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

© Agilent Technologies, Inc. 2007

Printed in Japan  
July 25, 2007  
5989-7073JAJP