

## LC-ICP-MSによる魚介類中の水銀形態別分析とオートサンプラーの自動希釈機能の紹介

仲 康佑、姜 雨晶、岩田 奈津紀

### ユーザーベネフィット

- ◆ LC-ICP-MSにより水銀を形態別に分離でき、魚介類中のメチル水銀および総水銀を正確に分析できます。
- ◆ 水銀形態別分析用のメソッドパッケージを用いることにより、分析条件などの新規検討および登録は不要です。
- ◆ オートサンプラーの自動希釈機能により検量線試料を自動調製でき、手間が省けます。

### ■はじめに

水銀は食物連鎖を通じて蓄積されやすく、魚介類等の一部の食品には高濃度の水銀が含まれることがあります。また、水銀の中でもメチル水銀は最も毒性が高い化学形態として知られています。そのため、食品における水銀の毒性評価には、総水銀としての分析だけでなく、水銀の形態別分析が必要です。HPLCとICP-MSを組み合わせたLC-ICP-MS法は水銀を形態別に分離し、高感度に分析することができます。

本アプリケーションでは、ICPMS-2040/2050にNexera XS inertを接続したLC-ICP-MSシステムで、魚介類中の水銀の形態別分析を行い、メチル水銀と総水銀の濃度を測定しました。また、上記の分析において、Nexera XS inertのオートサンプラーによる自動希釈機能の真度と併行精度の評価を行いました。

### ■サンプルと前処理

市販のマグロをサンプルとして使用しました。

前処理は米国食品医薬品局（FDA）の元素分析マニュアル（EAM）4.8を参考に行いました<sup>1)</sup>。約0.25 gのマグロの可食部を秤量し、ピーズ破砕機を用い、30秒間細かく破砕しました。このとき、分析の妥当性確認のための添加試料には水銀標準液を添加しました。細かく破砕したサンプルに1 w/v%のL-システイン塩酸塩一水和物溶液を25 mL加えました。約60 °Cで120分間温浴（60分ごとに攪拌）した後、遠心分離し、上澄み溶液を0.45 μmのPTFEフィルタで濾過し、測定溶液としました。

### ■標準試料と移動相

#### ● 希釈溶液

1 w/v% L-システイン塩酸塩一水和物および8 v/v%メタノールとなるように希釈溶液を調製しました。

#### ● 水銀混合標準原液

市販の無機水銀1000 mg/L標準液を1 w/v% L-システイン塩酸塩一水和物溶液で1 mg/Lになるように希釈しました（無機水銀1 mg/L標準液）。市販の10 mg/Lメチル水銀、エチル水銀混合標準液をメタノールで1 mg/Lになるように希釈しました（アルキル水銀1 mg/L標準液）。

無機水銀1 mg/L標準液およびアルキル水銀1 mg/L標準液を各50 μg/Lになるように希釈溶液で混合、希釈し調製しました。

#### ● 検量線試料

水銀混合標準原液を希釈溶液で希釈して調製しました。検量線試料中の各形態のHgの濃度は0.5~20 μg/Lです。

#### ● 内標準溶液

市販のTl標準液を1 v/v%硝酸で100 μg/Lとなるように希釈し調製しました。

#### ● 移動相

0.01 mol/Lの酢酸アンモニウム溶液（0.12 w/v%のL-システインを含み、アンモニア水でpH値を7.5に調整）とメタノールを92：8で混合し調製しました。

### ■装置構成と分析条件

ICPMS-2040/2050にNexera XS inertを接続したLC-ICP-MSシステム（図1）を用い、分析を行いました。LabSolutions™ ICPMS TRMソフトウェアにより、HPLCをコントロールすることができ、試料の注入からクロマトグラムの解析まで、ひとつのソフトウェア上で行うことができます。分析条件は、「LC-ICP-MSメソッドパッケージ 水銀形態別分析」に収録されている条件を使用しました。表1にHPLCの装置構成・分析条件を、表2にICP-MSの装置構成・分析条件を示します。

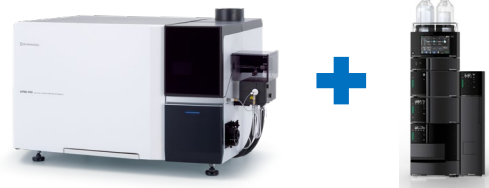


図1 LC-ICP-MSシステム

表1 HPLC構成・分析条件

システム	:	Nexera XS inert
カラム*1	:	Shim-pack Scepter™ C18-120 [Metal free column] (150 mm×4.6 mm I.D., 5 μm)
移動相	:	0.12 w/v%のL-システインを含む0.01 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 (pH 7.5) : メタノール=92 : 8
移動相流量	:	1 mL/min
カラム温度	:	40 °C
注入量	:	50 μL
リンス液 (R0)	:	純水
バイアル*2	:	イオンクロマトグラフ用PPバイアル&セプタム付キャップセット (1.5mL)

\*1: P/N : SSOT-227-31076-03

\*2: P/N : SSOT-AG-GLC-IVS-100

表2 ICP-MS構成・分析条件

装置	:	ICPMS-2040/2050
ネブライザー	:	ネブライザー DC04
トーチ	:	ミニトーチ
チャンバー	:	サイクロンチャンバー
サンプリングコーン	:	ニッケル製
スキマーコーン	:	ニッケル製
高周波出力	:	1.20 kW
サンプリング深さ	:	7.0 mm
プラズマガス流量	:	9.0 L/min
補助ガス流量	:	1.10 L/min
キャリアガス流量	:	0.85 L/min
希釈ガス流量	:	0 L/min
セルガス	:	He
セルガス流量	:	6.0 mL/min
セル電圧	:	-25 V
エネルギーフィルター	:	7 V

## ■ 標準液の分析

図2に検量線最下点の0.5 µg/Lの無機水銀、メチル水銀、エチル水銀のクロマトグラムを示します。無機水銀、メチル水銀、エチル水銀をそれぞれ分離し、検出することができました。検量線を図3に示します。相関係数0.999以上の良好な直線性を得ることができました。また、検量線試料と同様に調製した各化学形態の水銀を0.2 µg/L含有する標準液を10回繰り返し分析し、得られた標準偏差の3倍の信号を与える濃度を検出下限として算出しました（表3）。

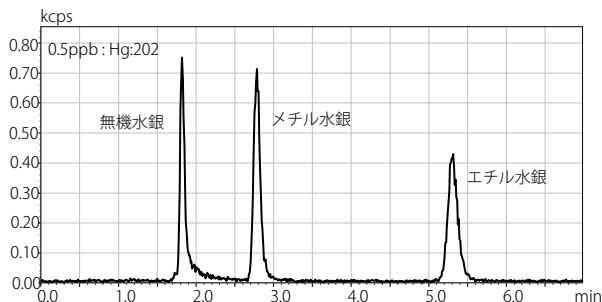


図2 0.5 µg/L標準液のクロマトグラム

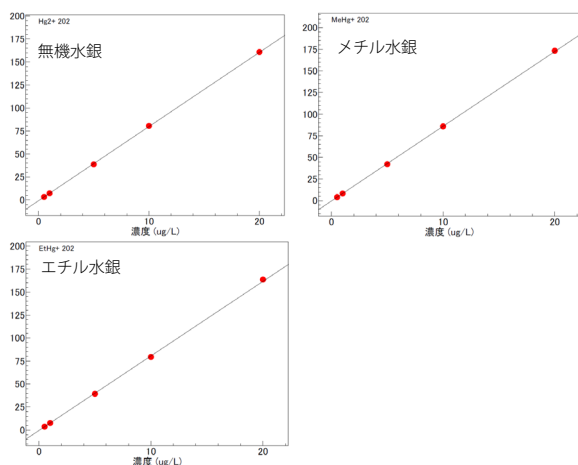


図3 水銀の検量線

表3 相関係数および検出下限

化合物	相関係数	検出下限 µg/L
無機水銀	0.99994	0.02
メチル水銀	0.99996	0.01
エチル水銀	0.99988	0.03

## ■ マグロ中の水銀の分析

図4にマグロ抽出液のクロマトグラムを示します。FDA EAM4.8に従い、マグロに含まれるメチル水銀の濃度と総水銀の濃度を分析しました。このメソッドでは、総水銀の濃度は無機水銀とメチル水銀の和として算出されます。マグロの分析結果および添加回収試験の結果を表4に示します。メチル水銀と総水銀それぞれで102%と105%の良好な回収率が得られました。

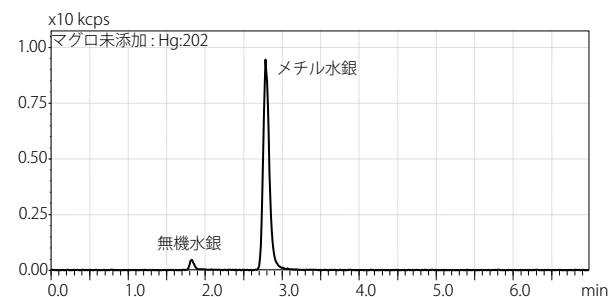


図4 マグロ抽出液のクロマトグラム

表4 マグロ分析結果

水銀化学形態	メチル水銀	総水銀
測定溶液中分析結果 (µg/L)		
マグロ	6.16	6.48
添加濃度	10	20
添加回収率	102%	105%
マグロ中分析結果 (mg/kg)		
マグロ	0.614	0.646
CODEX基準値 <sup>2)</sup>	1.0	

## ■ 自動希釈機能による検量線試料の調製

LC-ICP-MSの分析では、標準試料を用いて検量線を作成し、定量分析することが一般的です。しかし、検量線試料の調製には手間がかかります。近年、業務効率化や生産性向上を図るために、調製の自動化が望まれています。

Nexera XS inertのオートサンプラーには自動希釈機能が搭載されています。希釈倍率や混合動作に関する条件はLabSolutions ICPMS TRMで設定することが可能です。オートサンプラーのラックモード図と自動希釈のための前処理プログラムの設定画面を図5および図6に示します。水銀混合標準原液を入れたバイアル（緑色）から希釈倍率に応じた量を吸引し、予めオートサンプラーにセットしておいた空のバイアル（混合用バイアル：橙色）に希釈液と共に吐出します。混合用バイアルの中で攪拌を行い、検量線試料を調製することができます。この時、自動希釈により得られる最終液量は100 µLです。前処理プログラムのコマンドの一部を表5に示します。なお、バイアル位置や希釈倍率をカスタマイズする場合は、表5の水色背景のコマンドを編集します。

この機能を用い、0.5 µg/Lから20 µg/Lの検量線試料を自動調製しました。自動希釈の評価に用いたHPLCの装置構成・測定条件を表6に示します。

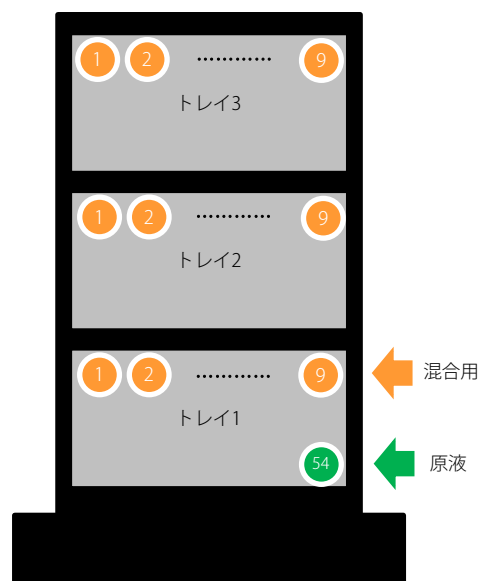


図5 オートサンプラーのラックモード図  
(原液バイアル: トレイ番号1、バイアル番号54)

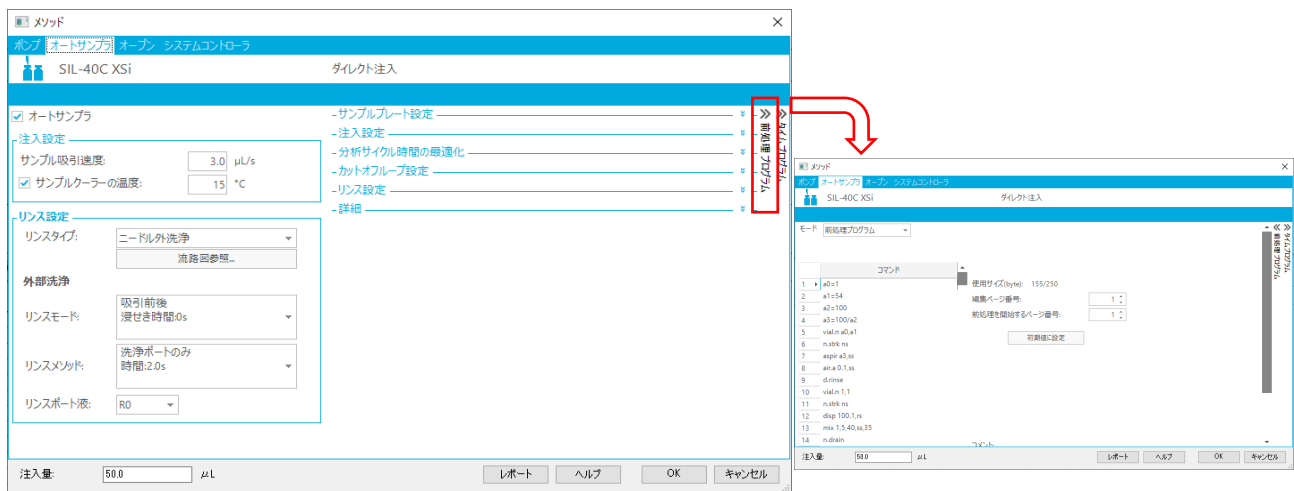


図6 オートサンプラーの前処理プログラムの設定画面

表5 前処理プログラムのコマンド (特許出願中)

ライン	コマンド	備考
1	a0=1	原液のトレイ番号の指定
2	a1=54	原液のバイアル番号の指定
3	a2=100	希釈倍率 (1つ目の試料) の指定
4	a3=100/a2	原液吸引量の計算 (希釈後容量: 100 $\mu$ L)
5	n.drain	ニードルおよびニードルループ内をリンス液で置換後、ニードル先端の浸漬洗浄
6	disp 600.0,rs	
7	d.rinse	
8	vial.n a0,a1	原液バイアルからa3 $\mu$ Lだけ吸引
9	n.strk ns	
10	aspir a3,ss	
11	air.a 0.1,ss	空気 (0.1 $\mu$ L) の吸引
12	d.rinse	ニードル先端の浸漬洗浄
13	vial.n 1,1	希釈調製するバイアル (トレイ番号1、バイアル番号1) に100.1 $\mu$ L*を吐出し、攪拌 ※100.1 $\mu$ L = 希釈後容量 + 空気
14	n.strk ns	
15	disp 100.1,rs	
16	mix 1,5,40,ss,35	
17	n.drain	ニードルおよびニードルループ内をリンス液で置換後、ニードル先端の浸漬洗浄
18	disp 100.0,rs	
19	d.rinse	
20	a2=50	希釈倍率 (2つ目の試料) の指定
21	a3=100/a2	原液吸引量の計算 (希釈後容量: 100 $\mu$ L)
~~~~~		
49	inj.p	注入ポートへ移動
50	v.inj	インジェクト状態にする
51	wait 2.0	2分待機 (送液ポンプによる高圧洗浄)
52	start	スタート信号
53	end	前処理プログラムの終了

表6 HPLC構成・分析条件 (自動希釈)

システム	: Nexera XS inert
カラム*1	: Shim-pack Scepter C18-120 [Metal free column] (150 mm $\times$ 4.6 mm I.D., 5 $\mu$ m)
移動相	: 0.12 w/v%のL-システインを含む0.01 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 (pH 7.5) : メタノール=92 : 8
移動相流量	: 1 mL/min
カラム温度	: 40 $^{\circ}$ C
注入量	: 50 $\mu$ L
ニードル	: 45 $\mu$ m
ストローク	: 45 $\mu$ m
リンス液 (R0)	: 希釈溶液 (1 w/v% L-システイン塩酸塩一水和物および8 v/v%メタノール)
混合用バイアル*2	: Shimadzu Vial, LC, 1mL, Polypropylene
原液用バイアル*3	: イオンクロマトグラフ用PPバイアル&セブタム付キャップセット (1.5mL)

\*1: P/N: SSOT-227-31076-03

\*2: P/N: 228-31600-91

\*3: P/N: SSOT-AG-GLC-IVS-100

### ■ 自動希釈機能で作成した検量線の評価

自動希釈機能で作成した検量線の評価を行いました。自動希釈機能で作成した検量線 (図7) を用い、手作業で調製した無機水銀、メチル水銀、エチル水銀を各1  $\mu$ g/L含む溶液を分析し真度を確認しました。また、自動希釈機能を用いて6回繰り返し調製し再現性を確認しました。検量線の相関係数および評価した真度と併行精度の結果を表7に示します。

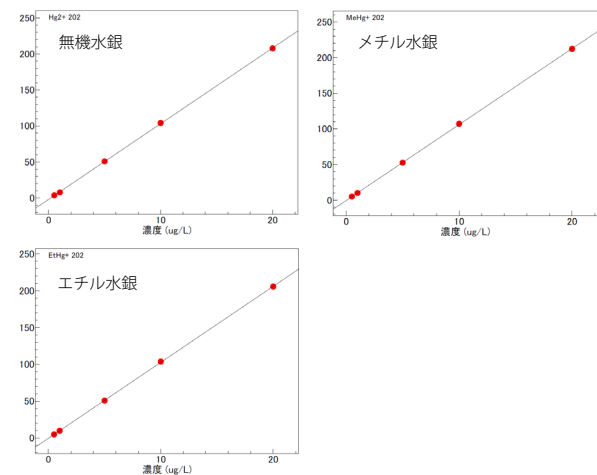


図7 自動希釈機能による検量線

表7 自動希釈機能の真度・併行精度の評価

化合物	相関係数	真度 % (1 µg/Lの分析結果)	併行精度 %RSD
無機水銀	0.99976	102%	4.0%
メチル水銀	0.99997	105%	1.6%
エチル水銀	0.99997	105%	2.8%

## ■まとめ

本アプリケーションでは、ICPMS-2040/2050にNexera XS inertを接続したLC-ICP-MSシステムを用い、「LC-ICP-MSメソッドパッケージ 水銀形態別分析」に収録されている分析条件で水銀の形態別分析を行いました。標準試料を用い、無機水銀とメチル水銀、エチル水銀を分離できることを確認しました。また、マグロ中のメチル水銀と総水銀を分析しました。良好な添加回収率が得られ、このシステムで魚介類中のメチル水銀と総水銀を正確に分析できることが分かりました。

Nexera XS inertのオートサンプラーの自動希釈機能を用い、各化学形態の水銀の検量線を作成しました。妥当性確認では、真度、精度ともに良好な結果が得られました。この機能を用いることで、検量線試料調製の手間を省くことができます。

前処理プログラムの詳細については、当社にお問い合わせ下さい。

### <参考文献>

- 1) U.S. Food and Drug Administration Elemental Analysis Manual 4.8 High Performance Liquid Chromatographic-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Determination of Methylmercury and Total Mercury, Version 1.0 (June 2008)
- 2) 食品及び飼料中の汚染物質及び毒素に関するコーデックス一般規格 (CODEX STAN 193-1995)

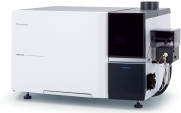
### <関連アプリケーション>

1. オートサンプラーの自動希釈機能を用いた簡単操作による検量線作成の省力化 [Application News No.01-00717](#)
2. オートサンプラーの自動希釈機能を用いた簡単操作による検量線作成の省力化 (2) [Application News No.01-00807](#)

Nexera、LabSolutions、およびShim-pack Scepterは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

＞ アンケート

**関連製品** 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



＞ ICPMS-2040/2050  
ICP質量分析計



＞ Nexera XS inert  
超高速液体クロマトグラフ



＞ LC-ICP-MS

## 関連分野

＞ 食品・飲料

＞ 有害金属

＞ 価格お問い合わせ

＞ 製品お問い合わせ

＞ 技術お問い合わせ

＞ その他お問い合わせ