



LC-ICP-MSを用いた魚介類中の水銀形態別分析およびオートサンプラーによる検量線作成のための高正確性自動希釈法

○岩田 奈津紀, 仲 康佑, 姜 雨晶, 小林 まなみ 島津製作所 分析計測事業部

1.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る。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る。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ある。一方、定量における検量線用標準液の調製には手間がかかるだけでなく、毒物である水銀の取扱いにおいては、特に試料調製の自動化が望まれる。

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、高感度分析が可能である。本研究では、ICPMS-2050IにNexera™ XS inertを接続したLC-ICP-MS(島津製作所製)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(無機水銀とメチル水銀の和)を定量した。また、HPLC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を確認した。

2. 実験

2-1. 実サンプル(マグロ)の前処理

試料には市販のマグロを使用した。前処理法は米国食品医薬品局(FDA)の元素分析マニュアル(EAM)4.8を参考に行った¹⁾。約0.25 gのマグロの可食部をビーズ破砕機で30秒間破砕した。細かく破砕した試料に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、上清を0.45 μmのPTFEフィルタで濾過し、試料溶液とした。

2-2. 標準液の調製

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、希釈し調製した。

検量線用標準液

水銀混合標準原液を希釈溶液で希釈して調製した。標準液中の各形態の水銀濃度は、各0.5~20 μg/Lである。

内標準溶液

市販のタリウム(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た。

2-3. 分析条件

分析条件は、LC-ICP-MSメソッドパッケージ 水銀形態別分析(島津製作所製)に収録されている条件を使用した。なお、移動相は、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、分析カラムは、Shim-pack Scepter™ C18-120(メタルフリー、150 mm×4.6 mm I.D., 5 μm、島津製作所製)である。

表1 HPLC分析条件(定量用)	
システム	: Nexera XS inert
カラム	: 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
流量	: 1 mL/min
カラム温度	: 40 °C
注入量	: 50 μL
リンス液	: 超純水
バイアル	: 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)



図1 LC-ICP-MSシステム

表2 ICP-MS分析条件	
装置	: ICPMS-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

2-4. 自動希釈機能による検量線用標準液の調製

自動希釈のためのオートサンプラーの動作の概要を図2に、ラック模式図を図3に示す。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た。混合用バイアルの中で攪拌を行い、検量線用標準液を調製できる。この時、自動希釈により得られる最終液量は100 μLである。自動希釈のための前処理プログラムの設定画面を図4に、前処理プログラムのコマンドの一部を表3に示す。

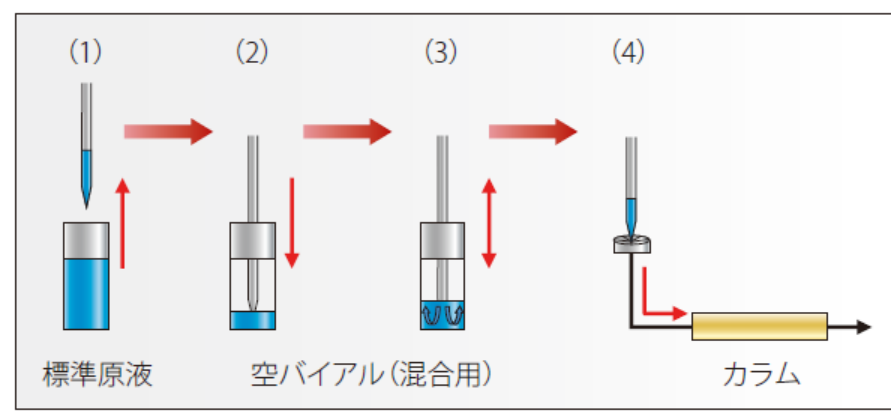


図2 オートサンプラーによる自動希釈の動作概要



図3 オートサンプラーのラック模式図
原液バイアル:トレイ番号1、バイアル番号54

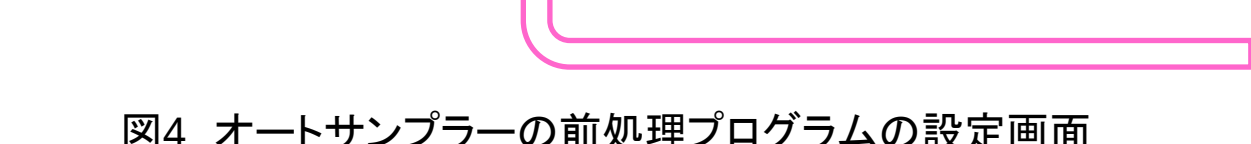


図4 オートサンプラーの前処理プログラムの設定画面

表3 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 μL)
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 μLだけ吸引
9	n.strk ns	
10	aspir a3,ss	
11	air.a 0.1,ss	空気(0.1 μL)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 μLを吐出し、攪拌 ※100.1 μL=希釈後容量+空気
14	disp 100.1,rs	
15	mix 1.5,40,ss,35	
16	n.drain	
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 μL)
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

この機能を用い、各0.5~20 μg/Lの検量線用標準液を自動調製した。自動希釈の評価に用いたHPLCの分析条件を表4に示す。なお、ICP-MSの分析条件は表2と同じである。

表4 HPLC分析条件(自動希釈)	
システム	: Nexera XS inert
カラム	: 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
流量	: 1 mL/min
カラム温度	: 40 °C
注入量	: 50 μL
ニードルストローク	: 45 mm
希釈液(リンス液)	: 1 w/v%のL-システイン塩酸塩一水和物および8 v/v%メタノール
混合バイアル	: Shimadzu Vial, LC, 1mL, Polypropylene
原液および試料バイアル	: 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)

3. 結果と考察

3-1.標準品を用いた水銀形態別分析

LC-ICP-MSを用いることで無機水銀、メチル水銀、エチル水銀をそれぞれ分離検出できた。図5に検量線最下点の各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す。各成分の検量線の直線性について、相関係数はいずれも0.999以上であった(図6)。混合標準液(各0.2 μg/L)の10回繰り返し分析から得られた検出下限は、それぞれ0.02、0.01、0.03 μg/Lであった(表5)。

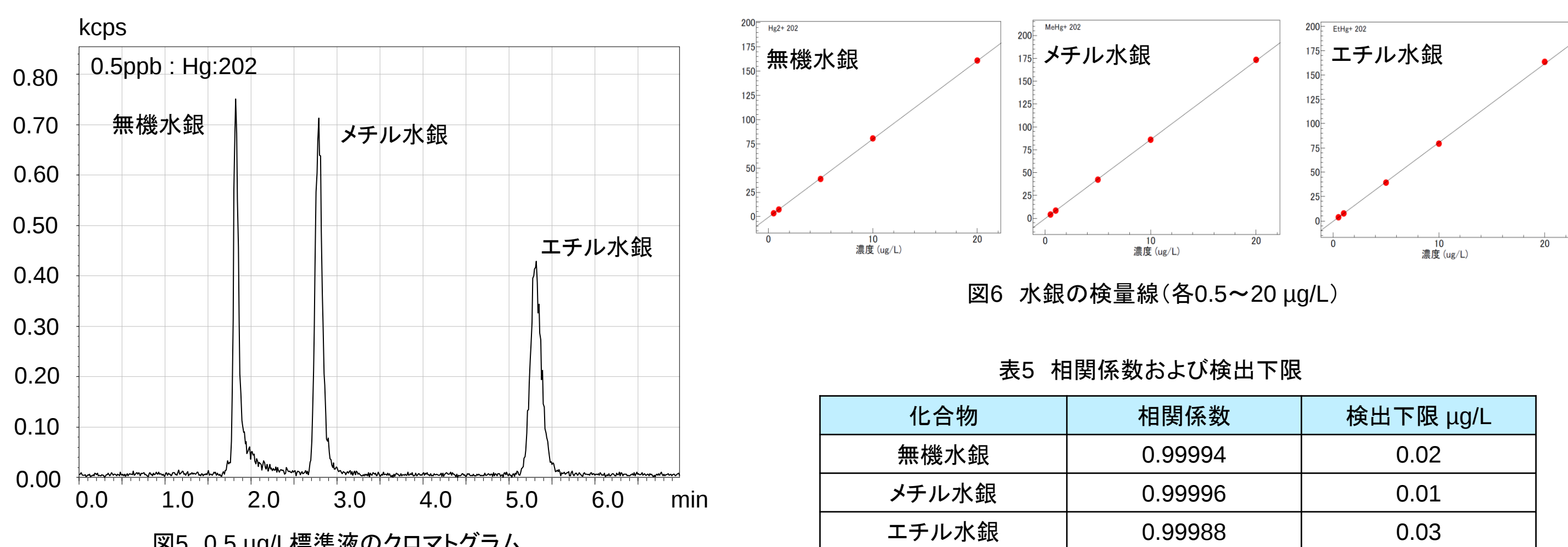


図6 水銀の検量線(各0.5~20 μg/L)

表5 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

3-2.マグロ中の水銀形態別分析

FDA EAM4.8に従い、マグロに含まれる水銀形態別分析を行った。なお、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る。図7にマグロ抽出液のクロマトグラムを、表6に分析結果および添加回収試験の結果を示す。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た。今回、使用したマグロ試料中のメチル水銀濃度は、CODEX²⁾の基準値以下であった。

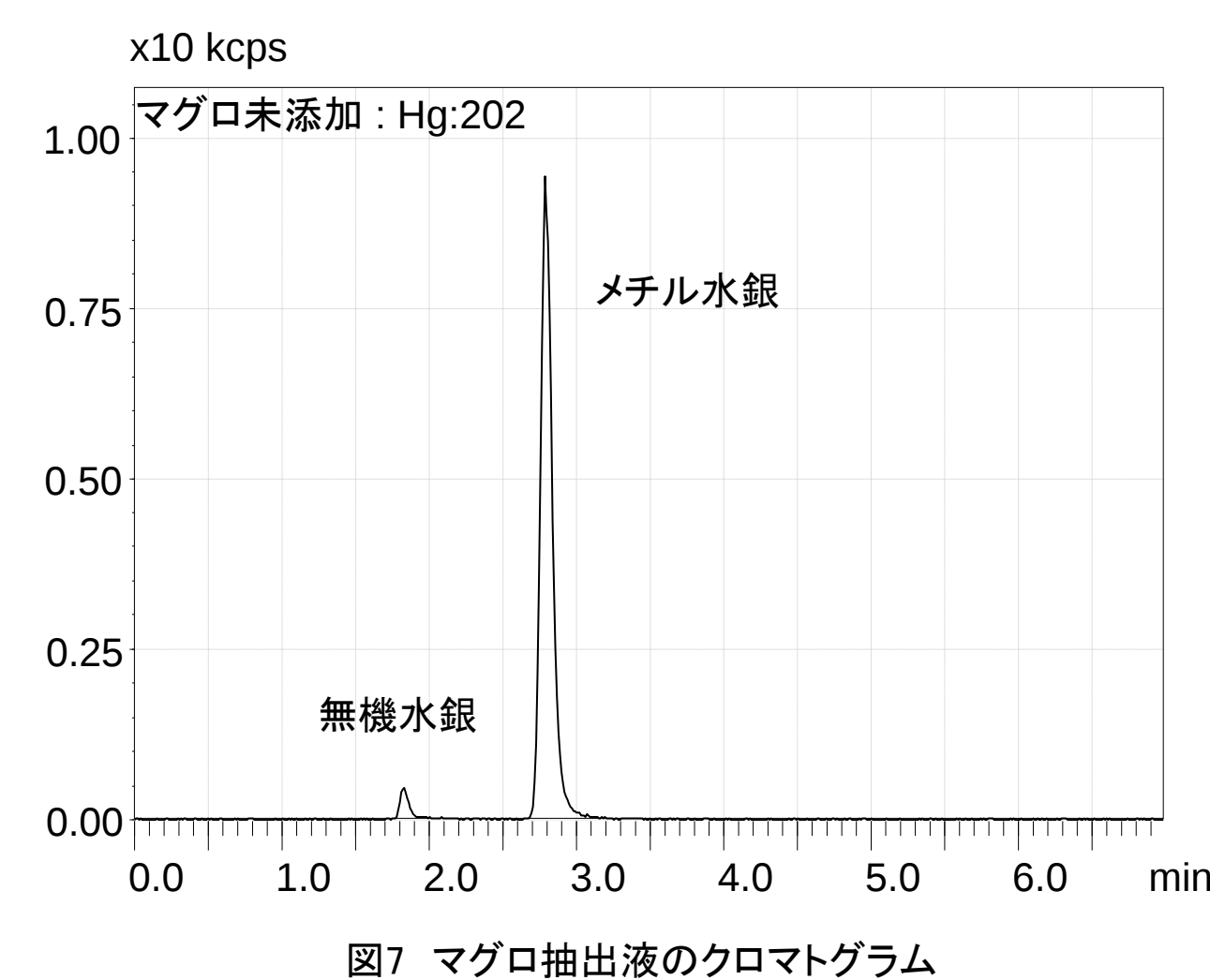


図7 マグロ抽出液のクロマトグラム

表6 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	1.0	

3-3. 自動希釈機能で作成した検量線の評価

オートサンプラーの自動希釈機能により検量線用標準液を自動調製し作成した検量線(図8)を用いて、手動で調製した混合標準液(各1 μg/L)を分析し真度を確認したところ、102~105%の結果が得られた。なお、検量線の直線性について、相関係数はいずれも0.999以上であった。また、自動希釈機能を用いて6回繰り返し調製した混合標準液(各1 μg/L)の再現性は、1.6~4.0%であった(表7)。

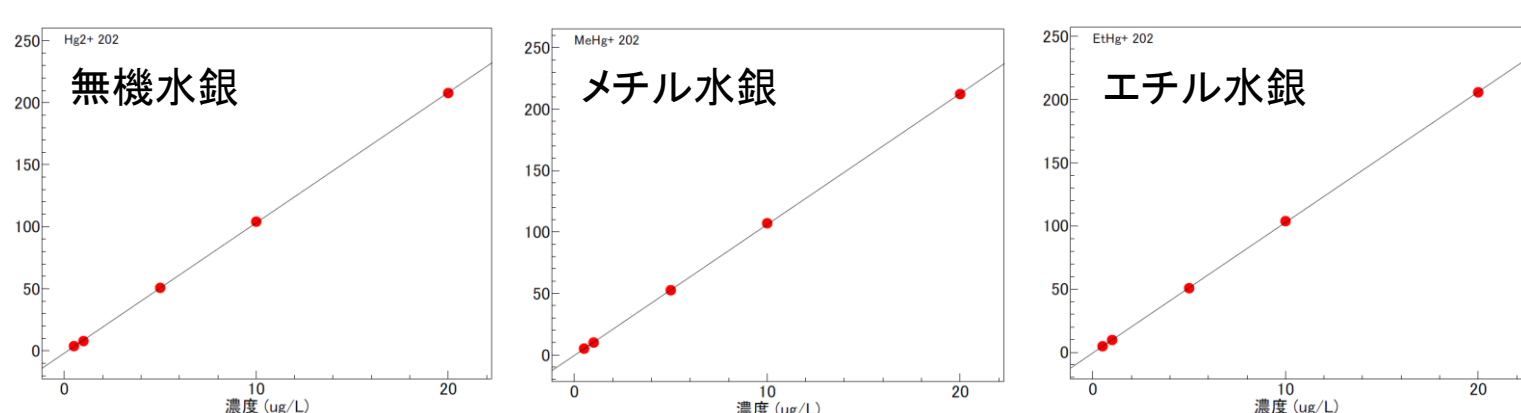


図8 自動希釈機能による水銀の検量線(各0.5~20 μg/L)

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%

4. 結論

- ✓ マグロ中の水銀形態別分析を実施したところ、メチル水銀と総水銀で良好な添加回収率が得られた。
- ✓ 任意の希釈率の検量線用標準液を自動調製しそのまま分析に供することで、検量線を簡便かつ正確に自動作成するメソッドを開発した。
- ✓ 手動での希釈調製の労力と時間および溶媒の消費量を削減できた。
- ✓ 毒物である水銀の安全な取扱いが可能となった。

以上より、LC-ICP-MSで魚介類中のメチル水銀と総水銀の濃度を正確に測定できた。また、オートサンプラーの自動希釈機能で調製した検量線の妥当性を確認できたため、本法を用いることで分析者の省力化だけでなく、安全の確保も期待できる。

[参考文献]
1) U.S. Food and Drug Administration Elemental Analysis Manual 4.8
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)
NexeraおよびShim-pack Scepterは、株式会社島津製作所の商標です。