

# HPLC-ICP-MSによる生体試料や環境試料中の水銀のスペシエーション分析

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社 エレメンタル営業部

EL09005

## Key Words

- HPLC-ICP-MS
- 生体試料
- 環境試料
- 水銀
- スペシエーション

## はじめに

水銀は、その毒性、移動性、水界生態系に及ぼす影響などにより、最も有害な環境汚染物質の1つです。環境中の大部分の水銀は、最初に揮発性の元素(Hg<sup>0</sup>)として存在しています。しかし、このHg<sup>0</sup>は容易に酸化されて無機形態のHg<sup>2+</sup>になり、その後、微生物の作用によってアルキル化され、最も毒性の強い種であるメチル水銀(MeHg<sup>+</sup>)となります。MeHg<sup>+</sup>種は、脂質にきわめて溶けやすく、魚類や海生動物相に容易に蓄積されることが分かっています。食物連鎖の生体内蓄積プロセスの結果として、肉食動物ではMeHg<sup>+</sup>がさらに高濃度に蓄積されることがあります。環境や生体試料に含まれるMeHg<sup>+</sup>をモニタリングすることは、ヒトの健康リスクの評価にとって不可欠です。MeHg<sup>+</sup>は超微量濃度であっても深刻な影響を与えることがあるため、正確な検出・定量を簡単に行える高感度の分析法が必要となります。GC-ICP-MSは、優れた検出限界を達成でき、化学種の分離能力が高く、また分析時間が短いなど、水銀のスペシエーション分析では既に一般的な手法になっています。しかし、もう1つの分析法であるHPLC-ICP-MSも水銀のスペシエーション分析に威力を発揮します。特に液体試料の場合、最小限の試料調製だけで迅速なスペシエーション分析を行うことができます。このアプリケーションノートでは、Thermo ScientificのHPLC-ICP-MSパッケージを使用して、特定の生体試料や環境試料に含まれるMeHg<sup>+</sup>を高感度で分析した例をご紹介します。

## HPLC-ICP-MSの構成

Thermo Scientific Surveyor™ HPLCとオートサンプラーをHPLCインターフェイスキット(P/N 4600485)とSurveyor LC接続ハーネス(P/N 4600487)を用いてXシリーズ 2 ICP-MSに連結しました。Xシリーズ 2は、標準の試料導入系と高感度Xsインターフェイスオプションを用いてホットプラズマ条件下で操作しました。ICP-MSのソフトウェアPlasmaLabとHPLCのソフトウェアXcaliburのパッケージを外部トリガーカード(P/N 4600261)と組み合わせることにより、双方向通信によるHPLC制御やインテリジェントピーク積分が可能です。HPLC-ICP-MSのHPLCパラメータと分析条件を表1に示します。



表1 HPLC-ICP-MS測定条件

カラム	Hypersil GOLD (150 x 4.6 mm, 5 μm)
注入量	100 μL
流量	1.5 mL/分
移動相(Isocratic)	60mM 炭酸アンモニウム、5% メタノール、0.001% 2-メルカプトエタノール
ネブライザー	ガラス同軸型
スプレーチャンバー	インパクトビード型
トーチ	石英一体型(1.5mmインジェクター)
インターフェース	Xs Ni インターフェース (Xs <sup>-</sup> モード)
RF出力	1100 W
ネブライザーガス流量	0.90 L/分
補助ガス流量	0.90 L/分
冷却ガス流量	13 L/分
データ取得モード	トランジェント時間分解分析(TRA)
同位体と積算時間	<sup>200</sup> Hg, <sup>202</sup> Hg (100ms)
AMU当たりのチャンネル	1
タイムスライス時間	203 ms
1回の測定時間	600 s

## 試料調製

本メソッドを標準物質 CRM DORM-2(ソノザメ筋肉)を用いて評価しました。約200mgの試料を清浄な乾燥したマイクロウェーブ抽出容器に分取し(3連)、各試料容器に25%テトラメチル水酸化アンモニウム溶液(TMAH)4 mLを加え、テフロンコーティングしたマグネチックスターラーを入れました。マイクロウェーブ分解装置(CEM Discover)を用い、自動マイクロウェーブ抽出を30Wで3分間行いました。また、汽水および尿試料も測定しましたが、水試料は重クロム酸カリウム/硝酸混液を用いて保存する以外に、特に試料調製をする必要はありません。必要に応じて試料はHPLCの移動相を用いて希釈しました。

## 結果と考察

HPLC-ICP-MSによりMeHg<sup>+</sup>と無機Hg<sup>2+</sup>標準を分離することができ、保持時間はそれぞれ390秒および465秒でした(図1(a))。外部検量線は、ブランクとMeHg<sup>+</sup>およびHg<sup>2+</sup>の0.1、0.5、1、2および5 ng/g標準溶液を用いてPlasmaLabで作成しました(図2)。

試料中のMeHg<sup>+</sup>種およびHg<sup>2+</sup>種の定量はこの外部検量線を用いて行いました。標準溶液と試料を自動積分することによって、定量値の処理を簡単に行うことができます。

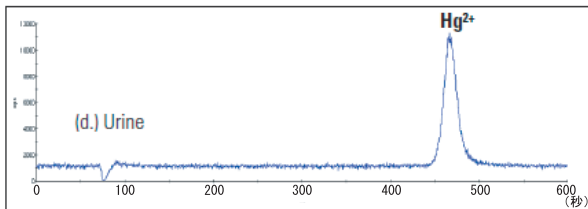
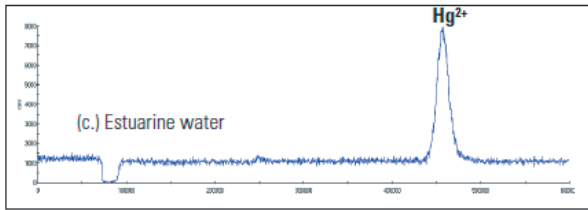
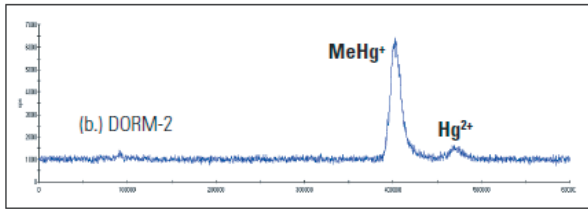
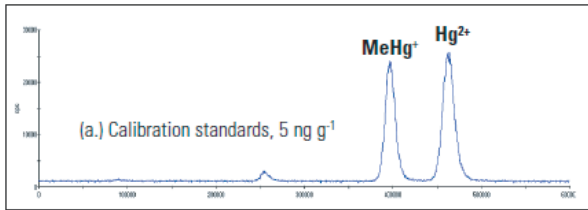


図1 HPLC-ICP-MSのクロマトグラム  
 (a.) 市販のMeHg<sup>+</sup>およびHg<sup>2+</sup>の標準液 (5 ng/g)  
 (b.) 50倍に希釈したDORM-2抽出物  
 (c.) 未希釈の汽水  
 (d.) 未希釈の尿

このメソッドをバリデーションするために、CRM DORM-2(ツノザメ筋肉)を3連で抽出、分析しました。DORM-2組織中のMeHg<sup>+</sup>およびHg<sup>2+</sup>のクロマトグラムを図1 (b.)に示します。MeHg<sup>+</sup>の濃度が検量線範囲内に入るようにするためにCRM抽出試料を50倍に希釈する必要がありました。定量値を表2に示します。MeHg<sup>+</sup>の認証値 4.47 μg/gとよく一致しています。

汽水および尿試料は直接分析しました。クロマトグラムをそれぞれ図2 (c.)と(d.)に示します。これらの試料ではいずれも、無機Hg<sup>2+</sup>種は検出されましたが、MeHg<sup>+</sup>種は検出されませんでした。定量値を表2に示します。

表2 HPLC-ICP-MSによる試料の定量値

試料	定量値 (ng Hg / g)	
	MeHg <sup>+</sup>	Hg <sup>2+</sup>
CRM		
DORM-2(ツノザメ筋肉)	4274 ± 116	391 ± 23
認証値	4470 ± 320	-
未知試料		
尿	nd	2.51
汽水	nd	1.59

各試料にMeHg<sup>+</sup>およびHg<sup>2+</sup>の標準溶液を添加して、2つのクロマトグラムピークの同一性を確認しました。希釈したDORM-2抽出物と希釈した汽水および尿試料に1 ng/gのMeHg<sup>+</sup>およびHg<sup>2+</sup>標準溶液を添加して、回収率を求めた結果を表3に示します。

本メソッドの検出限界および定量限界は、メソッドブランク(n=5)の3σおよび10σから算出しました。この値も表3に示します。

表3 HPLC-ICP-MSによる添加回収率と検出限界

添加回収率 (%)	MeHg <sup>+</sup>	Hg <sup>2+</sup>
DORM-2(ツノザメ筋肉)	100	113
尿	88.3	92.4
汽水	102	114
メソッド検出限界 (ng/Hg g)	MeHg <sup>+</sup>	Hg <sup>2+</sup>
検出限界 (3s)	0.011	0.010
定量下限 (10s)	0.036	0.034

## まとめ

Thermo Scientific HPLC-ICP-MSパッケージは、最小限の試料調製で水性試料中や水性抽出物中のMeHg<sup>+</sup>およびHg<sup>2+</sup>を測定できる評価済みのソリューションを提供します。水銀化学種の溶出時間は10分です。外部トリガーカードとPlasmaLabソフトウェアにより、水銀のルーチンのスペシエーション分析を自動操作し自動積分することができます。

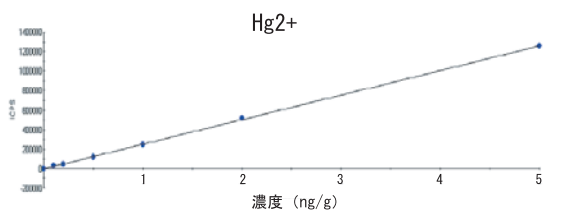
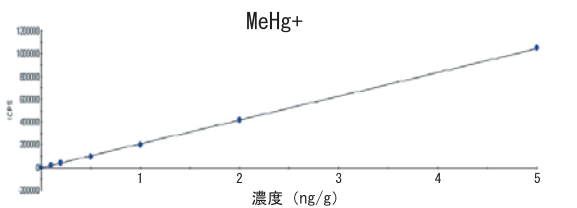


図2 MeHg<sup>+</sup>およびHg<sup>2+</sup>の検量線

EL09005

サーモフィッシャー  
サイエンティフィック株式会社

フリーダイヤル  
0120-753-670

FAX  
0120-753-671

E-mail  
info-jp@thermo.com