

# HPLC-ICP-MSによるミネラルウォーター中のクロム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

EL09008

## Key Words

- CCT
- クロム
- EDTA
- HPLC-ICP-MS
- 環境水
- スペシエーション



## はじめに

クロムはさまざまな工業プロセスに広範囲に使用されているほか、天然資源からも浸食されるために、環境中に広く存在します。環境中や食品・水源に存在するクロムをモニタリングすることは、曝露による潜在的リスクを評価する上で重要です。米国環境保護庁(EPA)と欧州連合(EU)は、飲料水指令で総クロムの最大許容濃度をそれぞれ0.1 mg/Lと0.05 mg/Lに規定しています。日本の水道水質基準は六価クロム化合物として0.05 mg/Lを設定しています。

クロムの毒性、反応、バイオアベイラビリティ: 生物学的利用能などは形態によって大きく異なるため、クロムの3価( $\text{Cr}^{\text{III}}$ )と6価( $\text{Cr}^{\text{VI}}$ )の原子価状態を識別することも重要です。 $\text{Cr}^{\text{III}}$ は糖、タンパク質および脂肪の代謝に不可欠ですが、一方 $\text{Cr}^{\text{VI}}$ はその高い酸化力により強い毒性があります。クロムやクロム化学種の環境曝露によるヒトへの健康リスクを評価するには、高い感度でスペシエーション分析ができるメソッドが必要です。

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た、水性マトリックス中のクロムのスペシエーション分析例をご紹介します。HPLC逆相法では、 $\text{Cr}^{\text{III}}$ とEDTAの錯体形成能を用いて分離を加速させました。移動相には炭素が含まれるため、コリジョンセル(CCT<sup>®</sup>)を最適化して $^{52}\text{Cr}$ に対する多原子イオン干渉 $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ を除去しました。このCCTによって水試料のマトリックスからの干渉も抑制しました。この分析メソッドを、標準物質(CRM BCR-544、凍結乾燥溶液)を用いて評価し、市販のミネラルウォーター5種類を分析しました。またメソッド検出限界を求めました。

## HPLC-ICP-MSの構成

Thermo Scientific SpectraSYSTEM<sup>™</sup> HPLCとAS3500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SpectraSYSTEM HPLC 接続ハーネス(P/N 4600488)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Xtインターフェイス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 $\mu\text{m}$ )
注入量	50 ~ 200 $\mu\text{L}$
流量	0.8 mL/分
移動相(Isocratic)	2mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、0.25mM リン酸テトラブチルアンモニウム(TBAP)、pH 6.9
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	Xt Ni インターフェース
RF出力	1300 W
ネブライザーガス流量	0.88 L/分
補助ガス流量	0.85 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	$^{52}\text{Cr}$ (200ms) $^{50}\text{Cr}$ , $^{51}\text{V}$ , $^{53}\text{Cr}$ , $^{54}\text{Cr}$ (50ms)
AMU当たりのチャンネル	1
タイムスライス時間	407 ms
1回の測定時間	400 s
CCTガス	8% $\text{H}_2$ / He ベース 4 mL/分
KED電圧	2V

## 試料調製

分析に用いる標準溶液の原液は、各クロム標準(クロム(III)およびクロム(VI))の市販の標準溶液(1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を適量採取し、HPLC移動相で希釈して調製しました。この原液は4°Cの冷蔵所で保管しました。標準物質CRM BCR-544(凍結乾燥溶液)は、CRMに付属の認証報告書に記載されている方法に従って抽出しました。この試料を20mLの $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ 緩衝液(pH 6.4)を用いて再調製しました。再調製後のCRMの分取試料は20 mM EDTA、2.5 mM TBAPにより1:1に希釈しました。未知試料は20 mM EDTA、2.5 mM TBAPにより9:1に希釈しました。添加回収実験用に $\text{Cr}^{\text{III}}$ と $\text{Cr}^{\text{VI}}$ の標準溶液を、EDTA溶液で希釈する前に各試料に添加しました。各試料は70°Cに加熱したウォーターバスに1時間入れて、 $\text{Cr}^{\text{III}}$ とEDTAの錯体形成を加速させました。

## 結果と考察

分析後、Xシリーズ 2 PlasmaLabソフトウェアによりクロマトグラムが自動的に表示されます。1  $\mu\text{g}/\text{L}$ 濃度の標準溶液のクロマトグラムを図1(a)に示します。EDTAを錯体形成剤として用いたHPLC法では、215秒および260秒の保持時間でそれぞれ $\text{Cr}^{\text{III}}$ および $\text{Cr}^{\text{VI}}$ の分離が可能でした。外部検量線は、ブランクと0.1、0.2、0.5、1、2、および10  $\mu\text{g}/\text{L}$ の $\text{Cr}^{\text{III}}$ および $\text{Cr}^{\text{VI}}$ を含む標準溶液を用いて作成しました。

$\text{Cr}^{\text{III}}$ と $\text{Cr}^{\text{VI}}$ の化学種は、図2に示す外部検量線によりPlasmaLabの自動ピーク積分機能で定量しました。

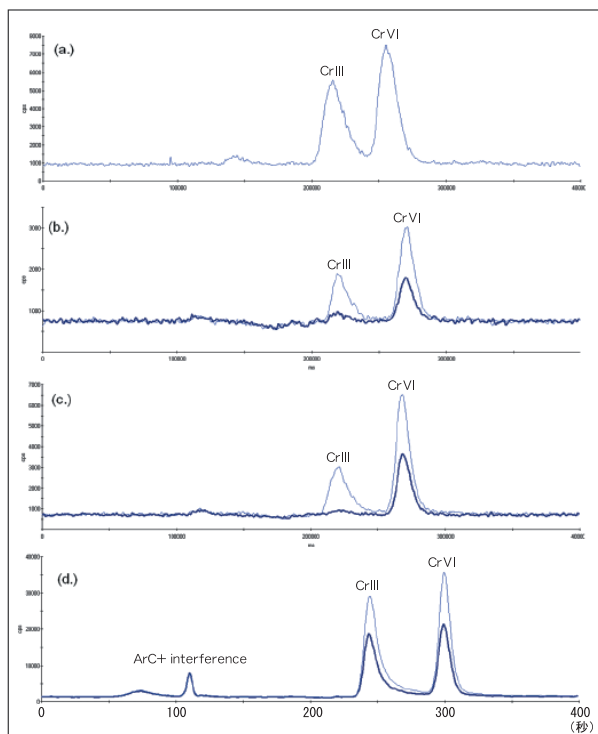


図1  $m/z$  52のHPLC-ICP-MSクロマトグラム:  
 (a)  $\text{Cr}^{\text{III}}$ と $\text{Cr}^{\text{VI}}$ 標準溶液 (1  $\mu\text{g/L}$ )  
 (b) 試料D:無添加(太線)と0.19  $\mu\text{g/L}$  添加(細線)  
 (c) 試料E:無添加(太線)と0.46  $\mu\text{g/L}$  添加(細線)  
 (d) CRM BCR-544:無添加(太線)と10.1  $\mu\text{g/L}$  添加(細線)  
 (a.)~(c.):200  $\mu\text{L}$ 注入 (d.):50  $\mu\text{L}$ 注入

分析したミネラルウォーター試料(A~E)はスーパーマーケットで市販のものです。各試料は3回繰り返して分析しました。これらのミネラル含量および $\text{Cr}^{\text{III}}$ と $\text{Cr}^{\text{VI}}$ の定量値を表2に示します。試料DとEのクロマトグラムをそれぞれ図1 (b.) および(c.) に示します。これらはすべて主要な化学種として $\text{Cr}^{\text{VI}}$ を含み、その濃度は0.054~0.409  $\mu\text{g/L}$ の範囲でした。5つの試料のうち3試料は検出限界を超える濃度の $\text{Cr}^{\text{III}}$ を含んでいましたが、定量下限ぎりぎりの濃度でした。これらの試料ではクロム種が低濃度であったため、注入量を200  $\mu\text{L}$ として検出限界と定量限界を改善しました(検出限界性能を表3に示します)。また、錯体形成操作前に試料に添加した $\text{Cr}^{\text{III}}$ および $\text{Cr}^{\text{VI}}$ 標準溶液の回収率を測定することにより、ミネラルウォーター試料について本メソッドをバリデートしました(表2参照)。分析した5つの試料について添加回収率は、0.1  $\mu\text{g/L}$ という低濃度の添加量に対し、90~105%の範囲でした。

表2 水試料とCRM BCR-544の $\text{Cr}^{\text{III}}$ と $\text{Cr}^{\text{VI}}$ の定量値と添加回収率

試料	ミネラル含量(mg/L)とその他の性状										定量値( $\mu\text{g/L}$ )		回収率(%)	
	Na	Ca	Mg	K	$\text{CO}_3$	$\text{SO}_4$	$\text{NO}_3$	Cl	pH	Residue	$\text{Cr}^{\text{III}}$	$\text{Cr}^{\text{VI}}$	$\text{Cr}^{\text{III}}$	$\text{Cr}^{\text{VI}}$
A	2.8	1.2	0.2	0.4	4.9	3.3	2.3	3.2	6	19	n.d.	0.054 ± 0.003	110	104
B	11.6	11.5	8	6.2	71	8.1	6.3	13.5	7	130	n.d.	0.149 ± 0.008	92	98
C	13	63	23	1.8	300	14	2	11	7.4	290	0.045 ± 0.008	0.125 ± 0.013	90	106
D	5	78	24	1	357	10	3.8	4.5	7.2	309	0.036 ± 0.006	0.159 ± 0.002	100	105
E	35	49	12	1	186	17	5	54	7.8	288	0.060 ± 0.005	0.409 ± 0.002	105	98
BCR 544					4200			905			24.57 ± 2.56	23.94 ± 0.43	*92	*105

\* BCR544の回収率は認証値に対する%として表示

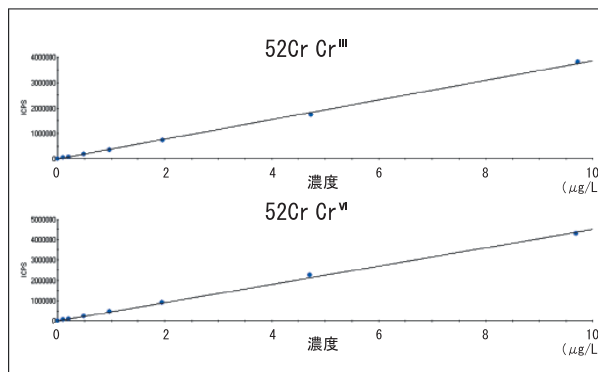


図2  $\text{Cr}^{\text{III}}$ と $\text{Cr}^{\text{VI}}$ の検量線

CRM BCR-544(凍結乾燥溶液)の2つの別々の瓶を2回分析して、本メソッドを評価しました。再調製したBCR-544のクロマトグラムを図1 (d.) に示します。このCRMではクロム種の濃度が高かったために、注入量を50  $\mu\text{L}$ として検量線溶液と試料を測定しました。クロマトグラムでは、CRMに $\text{Cr}^{\text{III}}$ と $\text{Cr}^{\text{VI}}$ が認められ、また、炭素ベースのマトリックスがボイド容量の近くで溶出したために、 $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ の干渉が $m/z$  52に生じたことが示されています。これは再調製後の試料中の炭酸塩濃度が高いこと(0.042%)に起因していると思われます。定量値を表2に示しましたが、 $\text{Cr}^{\text{III}}$ と $\text{Cr}^{\text{VI}}$ の測定値は認証値(26.8 ± 1.0, 22.8 ± 1.0  $\mu\text{g/L}$ )とよく一致していることがわかります。しかし、再調製後の溶液のpHは $\text{Cr}^{\text{III}}$ 種の加水分解を防ぐのにきわめて重要であるため、推奨されている $\text{CO}_2$ によるパーズの直後に錯体形成操作または分析を行う必要があります(詳細については、CRM 544の認証報告書を参照してください)。

メソッド検出限界(MDL)と定量下限(LOQ)値は、メソッドブランク(n=5)の3 $\sigma$ および10 $\sigma$ から算出しました。試料注入量50  $\mu\text{L}$ および200  $\mu\text{L}$ に対する検出限界性能をBEC値とともに表3に示します。

表3 HPLC-ICP-MS法の検出限界性能

注入量 $\mu\text{L}$		$\text{Cr}^{\text{III}}$ $\mu\text{g/L}$	$\text{Cr}^{\text{VI}}$ $\mu\text{g/L}$
50	BEC	0.096	0.026
	LOD	0.039	0.017
	LOQ	0.131	0.056
200	BEC	0.018	0.002
	LOD	0.017	0.009
	LOQ	0.055	0.029

## まとめ

Thermo Scientific HPLC-ICP-MSパッケージは、 $\text{Cr}^{\text{III}}$ と $\text{Cr}^{\text{VI}}$ を迅速、正確、かつ高感度に分析するためのバリデート済みのソリューションを提供します。外部トリガーカードとPlasmaLabソフトウェア機能を用いて、クロム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。

EL09008

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@thermofisher.com

www.thermoscientific.jp  
(日本)  
www.thermo.com  
(グローバル)

©2009 Thermo Fisher Scientific Inc. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.

Specification, terms and pricing are subject to change. Not all products are available in all countries. Please consult your local sales representative for details.

**Thermo**  
SCIENTIFIC