

HPLC-ICP-MSによる魚組織に含まれるヒ素の 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

編集発行：事業企画部 プロダクトラインマーケティンググループ（エレメンタル）

EL09001

Key Words

- ヒ素
- 魚
- HPLC-ICP-MS
- ICP-MS
- スペシエーション

はじめに

海生動植物中のヒ素の蓄積および生物濃縮は近年、栄養面や貿易において多くの関心を呼んでいます。ヒ素と中毒の関連性はよく知られており、ヒト曝露に関連したリスクの可能性について多くの研究が行われています。しかし、元素の毒性をコントロールするのはヒ素の化学形態であることから、毒性学的リスクを評価する最も適切なデータはスペシエーション分析から得られます。概して、無機ヒ素種は有機ヒ素種よりも強い毒性があり、また三価のヒ素は五価のヒ素よりも強い毒性があります。環境中に存在するヒ素種は、自然または人為的に放出された後、化学的・生物学的変換を受けることによって多様となります。

海産生物はそれらの環境や食物源から1~100 mg/kgの範囲でヒ素を蓄積することが知られています。ヒ素の大部分は有機ヒ素種として存在し、これらは海水に含まれるか、あるいは藻類や他の魚などの食物源から蓄積された無機ヒ素が代謝されたものです。アルセノベタイン (AsB) は魚介類に認められる主要分子種であり、多くの場合、総ヒ素の50~90%を占めます。アルセノコリン、プロピオン酸トリメチルアルソニウム、ジメチルアルシン酸 (DMA)、テトラメチルアルソニウムイオンなどの微量分子種も報告されています。アルセノシュガーとして知られる分子種群は主に大型藻類で認められますが、ある種の甲殻類でも微量のアルセノシュガーが認められています。捕食魚はそれらの食物源に由来するAsBの生物濃縮プロセスによりヒ素濃度が非常に高くなる傾向があります。また、食植動物や腐食性生物は主要分子種としてAsBを含みますが、無機ヒ素、メチル化ヒ素や他の有機ヒ素種を含む場合もあります。しかし、魚に含まれるヒ素の完全なスペシエーションは、市販のヒ素含有標準品がないことから往々にして困難な状況にあります。

ヒ素のスペシエーションに関する最近の分析技術の多くは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) を組み合わせています。ヒ素種の大部分は水溶性であることから、HPLCの機構 (陰イオン交換、陽イオン交換、イオンペア) はこの応用に特に適しています。ICP-MSでは、溶出するヒ素種を高い感度で検出することができます。魚筋肉からヒ素種を定量的に抽出するには、多くの場合、水

性抽出で十分ですが、貝・甲殻類や魚の特定の部位など脂肪の多い組織では溶媒抽出を必要とすることもあります。抽出効率は超音波抽出や高速溶媒抽出 (ASE) などの手法により向上します。分析者は抽出や分析処理の間に分子種が分解されないように注意を払う必要があります。分子種の分解の度合いや分析誤差は、認証標準物質 (CRM) を用いて検証することができます。CRMは分析する試料を代表するものを選ぶべきで、また分析メソッドをバリデートする目的にも使用できます。



このアプリケーションノートでは、Thermo Fisher Scientific社のHPLC-ICP-MSパッケージを使用した、市販の魚組織に含まれるヒ素種のスペシエーション分析例をご紹介します。分析メソッドの回収率は抽出物に混合ヒ素標準を添加することによって測定し、メソッド検出限界は3 σ を用いて算出しました。本メソッドは標準物質CRM DORM-2 (ツノザメ筋肉) を用いてバリデートしました。

機器構成

Thermo Scientific Surveyor™ HPLCおよびオートサンプラーを、HPLCインターフェイスキット (P/N 4600485) およびSurveyor LC 接続ハーネス (P/N 4600487) を用いてXSERIES 2 ICP-MSに連結します。HPLCインターフェイスキットには、HPLCとICP-MSの電気的および分析的接続に必要な構成部品が全て含まれています。PlasmaLabソフトウェアと外部トリガーカード (P/N 4600261) 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の分析条件

オートサンプラー付きSurveyor HPLCは、水溶性ヒ素種を分離できるようにAtlasソフトウェアを用いてXSERIES 2 ICP-MSのPCからプログラムしました。XSERIES 2 ICP-MSは自動パフォーマンステストおよびオートチューニング機能を用いてHPLC-ICP-MS分析に必要な性能を確認、調整した後、最適化しました。ヒ素を含む分子種は陰イオン交換HPLCカラムを用いて分離し、pH 8.9の炭酸アンモニウム移動相を用いて溶出しました。HPLCパラメータとICP-MS分析条件を表1に示します。

カラム	高分子陰イオン交換 (250×4.6 mm, 10 μm)
注入量	20 μL
流量	1 mL/min
緩衝液A	10 mM炭酸アンモニウム、pH 8.9
緩衝液B	20 mM炭酸アンモニウム、pH 8.9
グラジエント	0~10 min; 100%緩衝液A 10~11 min; 100%緩衝液Aから 100%緩衝液B 11~20 min; 100%緩衝液B
RF出力	1350 W
ネブライザーガス流量	0.8 L/min
補助ガス流量	0.8 L/min
冷却ガス流量	13 L/min
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	⁷⁵ As (150 ms) ⁷⁷ Se, ⁸² Se, ⁸³ Kr (50 ms)
AMU当たりのチャンネル	1
タイムスライス時間	306 ms
測定時間	1800 s
スプレーチャンバー	インパクトビード型コニカルチャンバー
ネブライザー	ガラス同軸型
コーン	Xtインターフェイス

表1 HPLC-ICP-MS条件

ヒ素標準溶液の調製

各ヒ素標準 (亜ヒ酸塩、ヒ酸塩、モノメチルアルソン酸、ジメチルヒ酸およびアルセノバタイン) 1000 μg/gの保存溶液は、超純水 (18.2 MΩ) に市販の試薬を溶解して調製しました。この保存溶液を希釈し、分析に用いる標準溶液1 μg/gを作成しました。保存溶液は4℃の冷暗所で保管しました。

CRMおよび魚試料の調製

試料調製:

市販の魚試料 (まぐろ赤身、まぐろ缶詰、マスのフィレ、淡水パーチ、タラ、アラスカヘイクおよびヤリイカ) を超純水で個々に洗浄し、メスを用いて小さく切り刻んだ後、清浄な乾燥したバイアルに移しました。魚を24時間凍結した後に48時間の凍結乾燥を行い、組織の水分をすべて除去しました。その後乳棒と乳鉢を用いて乾燥組織を均質化し、粉末にしました。

試料の抽出:

抽出用試料の採取前に、粉末のCRM DORM-2を-20℃の保管庫から取り出し、室温になるまで1時間放置した後、手動で5分間攪拌することによって均質化しました。CRM 250±10 mgの部分試料を3連で清浄な乾燥した抽出容器に正確に量り取りました。また、凍結乾燥した市販魚の試料も約250 mg分量を抽出に用いました。超純水10 mLを各容器に加え、容器にキャップをしました。試料が分散するように、抽出前および抽出中にも15分ごとに容器を攪拌しました。抽出は50℃の超音波水槽中で2時間行いました。抽出後、各試料を2000 rpmで20分間遠心分離しました。上澄みを分取した後、ヒ素を含む分子種のピーク面積が完全に定量可能な検量線範囲内に入るように、各試料を適切に希釈しました。また、3本の操作ブランクを上記の手順によって調製し、これを用いてメソッド検出限界を求めました。

結果と考察

HPLC法では、亜ヒ酸 (AsIII)、AsB、DMA、モノメチルアルソン酸 (MMA) およびヒ酸 (AsV) の分離が可能でした。クロマトグラムは分析後にPlasmaLabソフトウェアで自動的に表示されます。ヒ素標準のクロマトグラフ分離の例を図1に示します。PlasmaLabソフトウェアではフレキシブルなデータ取得と積分パラメータ設定が可能であり、実験中の一連の試料分析に自動的に適用されます。

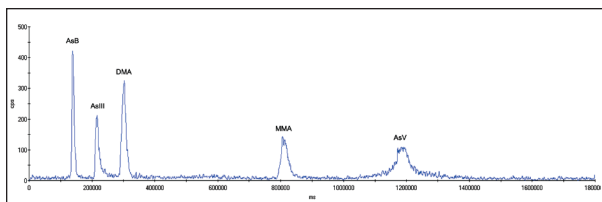


図1 5種類の市販のヒ素標準溶液のクロマトグラフィー (各 1 ng/mL As)

ヒ素分子種の定量は外部検量線法により行いました。ブランクおよび5種類の各ヒ素種を1, 5, 10および25 ng/g 含む標準溶液を用いて、検量線を作成しました。AsBおよびDMAの検量線を図2に示します。CRM DORM-2は、AsBについて認証されており、これを3連で抽出後、分析して、本法の妥当性を確認しました。メソッドブランクを調製した後、分析し、すべてのコンタミネーションについて補正しました。

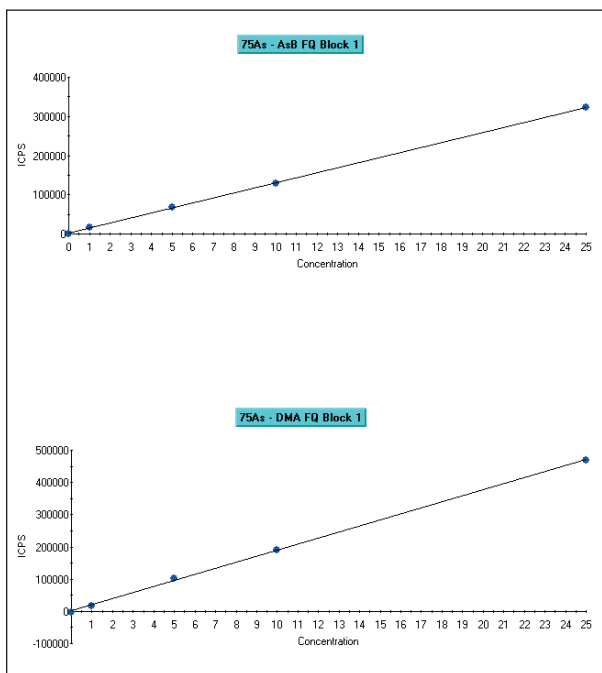


図2 AsBおよびDMA標準の検量線

2つのピークがDORM-2で認められ、標準溶液の保持時間との相関からAsBおよびDMAであると同定されました。検量線範囲内で定量するため、市販魚抽出試料は適切な希釈を行いました。各市販魚で同定された主要分子種はAsBでした。まぐろ赤身およびまぐろ缶詰にはAsVとMMA, DMAがそれぞれ含まれていましたが、これらの微量分子種は魚試料中の総ヒ素のわずか6%でした。ヤリイカでのみ認められた4番目の分子種は、この分子種の標準を使用しなかったため、同定できませんでした。しかし、Compound Independent Calibration法を用い(すなわち、すべての定量検量線の平均感度を用い)、この未知分子種の半定量値を算出しました。図3にSRM DORM-2およびいくつかの市販魚組織のクロマトグラムの例を示します。

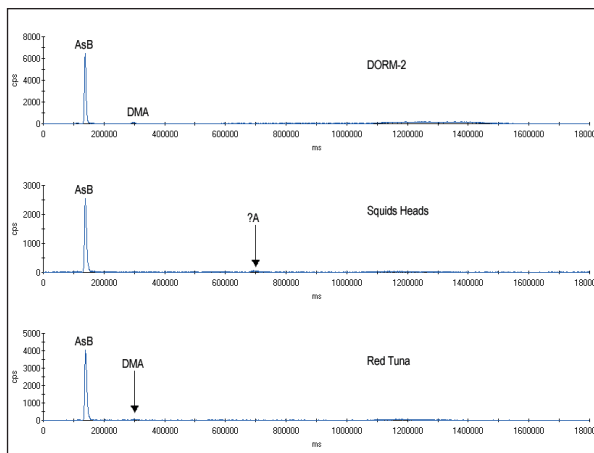


図3 DORM-2および魚試料(「ヤリイカ」および「まぐろ赤身」)のクロマトグラム

抽出物の分取試料で測定された濃度から、試料量および希釈係数を用いて、乾燥CRMおよび凍結乾燥した魚組織中の濃度を求めました。CRMの測定値はさらに水分含有量(5.2%)を補正しました。市販魚試料のヒ素種の濃度は、凍結乾燥処理で除去された水分量を用いて計算しました。表2にCRMおよび7つの魚試料で定量された濃度をまとめました。DORM-2 CRMで検出されたAsBの定量値は、認証値(16.4±1.1 μg/g)の95%以内でした。分析結果とDORM-2の認証値が一致することから、魚に含まれるヒ素のスペシエーション法として、今回の試料調製が適切であり、HPLC-ICP-MSメソッドの正確さが証明できました。

このメソッドをさらにバリデートするために、市販魚の2試料に加えたヒ素標準の添加回収率を求めました。表2に示すように、回収率は両組織に含まれる各分子種で、97%以上でした。

定量値 (μg/g As)

CRM	供給源	AsB	AsIII	DMA	未知分子A	MMA	AsV
DORM-2 (ツノザメ筋肉)	IRMM (ベルギー)	15.6 ± 1.04	-	0.2 ± 0.03	-	-	-
試料	供給源	AsB	AsIII	DMA	未知分子A	MMA	AsV
まぐろ赤身	大西洋北東部	3.9	-	0.11	-	-	0.13
まぐろ缶詰	エクアドル	3.42	-	0.12	-	0.08	-
マスのフィレ	フランス (養殖)	3.68	-	-	-	-	-
淡水パーチ	フランス	0.06	-	-	-	-	-
タラ	大西洋北東部	45.35	-	-	-	-	-
アラスカヘイクのフィレ*	太平洋	12.78	-	-	-	-	-
ヤリイカ*	インド洋	1.93	-	-	0.02	-	-

回収率 (%)

試料	供給源	AsB	AsIII	DMA	未知分子A	MMA	AsV
まぐろ缶詰	エクアドル	97.6	115.8	104.8	-	114.1	129.1
ヤリイカ*	インド洋	118.3	112.4	106.5	-	114.2	123.7

表2 様々な魚試料およびCRM DORM-2中のAsB, AsIII, DMA, MMAおよびAsVの定量値および未知分子種の半定量値

* 冷凍魚

5種類のヒ素種の検出限界を、メソッドブランクの3σから算出しました (n=3)。試料中の検出限界および絶対検出限界を表3に示します。

ヒ素を含む分子種の検出限界

	AsB	AsIII	DMA	MMA	AsV
3σ	ng/g 0.33	0.56	0.55	0.95	1.08
絶対値	pg 6.6	11.3	11.0	18.9	21.6

表3 本メソッドの検出限界性能

まとめ

Thermo Scientific HPLC-ICP-MSパッケージは、魚組織中のヒ素を含む分子種を高感度かつ正確に測定できる完全なソリューションを提供します。PlasmaLabソフトウェア機能により迅速な自動積分が可能で、生産性を高めるとともに、外部トリガーカードを組み合わせることによって、ルーチンのスペシエーション分析において失敗のない自動分析操作を可能にします。

EL09001

サーモフィッシャー
サイエンティフィック株式会社

横浜本社
045-453-9211

大阪支店
06-6863-1585

E-mail
info-jp@thermofisher.com

www.thermoscientific.jp
(日本)

www.thermo.com
(グローバル)

© 2006 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.