

高速液体クロマトグラフィー／誘導結合プラズマ質量分析法を用いた水中ヒ素の形態分析の検討

中山 和好, 成富 武治, 日野 隆信

Studies on Analytical Method of Species of Arsenic Compounds in Water by HPLC/ICP-MS

Kazuyoshi NAKAYAMA, Takeharu NARITOMI and Takanobu HINO

I はじめに

平成4年12月の水道法の改正によりヒ素の水質基準が従来の0.05mg/ℓから、発ガン性の再評価で0.01mg/ℓ以下に強化され、県内の井水において基準を超えるものが増加した。ヒ素は環境中に微量ながら無機化合物、有機化合物として広範囲にわたり存在し¹⁾、天然水中には無機化合物として酸化状態によりヒ素(Ⅲ)及びヒ素(V)が、有機ヒ素としてモノメチルアルソン酸、ジメチルアルシン酸として存在している事が知られている²⁾。ヒ素の毒性は化合物の種類により異なり、アルシン(水素化ヒ素) > ヒ素(Ⅲ) (致死量は1.5mg/kg体重) > ヒ素(V) > 有機ヒ素 (致死量は500mg (ジメチルアルシン酸)/kg体重) の順であると言われている³⁾。このように形態が異なることで毒性も大きく異なるので、水中ヒ素化合物の形態別の存在量を知ることは重要であり、形態別分析方法の検討が行われている。ヒ素の形態別の分析方法としてはヒ素を還元気化し原子吸光法で測定する方法²⁾、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と誘導結合型質量分析器 (ICP-MS) を組み合わせ形態別に一斉分析する方法が検討されている³⁾⁴⁾⁵⁾。本報では、ヒ素の形態分析をルーチンワーク化させるためにHPLC/ICP-MSによるヒ素の形態別分析の、基礎的な検討を行ったので報告する。

II 実験方法

1. 試薬

ヒ素化合物標準液として次の4種を用いた。ヒ素(V)溶液: H₃AsO₄ ICP-MS用100mgAs/ℓ (SPEX社製)。ヒ素(Ⅲ)溶液: As₂O₃ ICP-MS用1,000mgAs/ℓ (SPEX社製)。ジメチルアルシン酸 (DMAA) 溶液: カコジル酸 (CH₃)₂AsOOH (和光純薬社製) 0.1842gを精製水100mlに溶かし1,000mgAs/ℓの溶液を調製した。モノメチルアルソン酸 (MMAA) 溶液: (C H₃)AsO(OH)₂ (トリケミカル研究所製) 0.1867gを精製水100mlに溶かし1,000mgAs/ℓの溶液を調製した。使用時には精製水で適宜希釈した。

テトラエチルアンモニウムヒドロキッド (TEA) 溶液、コハク酸は和光純薬社製、硝酸は多摩化学社製TAMAPURE AA100を使用した。精製水はミリポア製超純水製造装置Milli-Q SP、TOCで製造したものをを用いた。

2. 装置

図1に使用した装置構成を示したが、HPLCのカラム出口とICP-MSのネブライザーを、長さ1m、外径1/16in、内径0.25mmのピークチューブで接続した。測定条件を表-1に示した。測定に先立ちICP-MSは0.01mg/ℓのマグネシウム、ロジウム、鉛混合溶液を用い、それぞれの質量数 (m/z), 24, 103, 208におけるシグナルが最大となるよう調整した。各ヒ素化合物の濃度は、質量数 (m/z) 75のカウンタ数で示されたクロマトグラムのピーク高さより、検量線法で求めた。

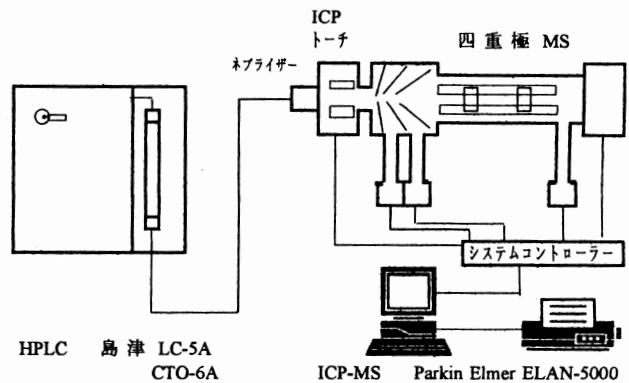


図-1 装置構成

表-1 測定条件

ICP-MS条件	
装置	Parkin Elmer ELAN-5000
高周波出力	1.0kW
プラズマガス流量	Ar15.0ℓ/min
補助ガス流量	Ar 0.8ℓ/min
キャリアーガス流量	Ar 0.9ℓ/min
モニタリング質量数	m/z = 75
デュエルタイム	200ms
HPLC条件	
装置	島津 LC-5A, CTO-6A
カラム	横河 Excelpak SEC-W12 300mm×7.8mm i.d
移動相流量	1.0ml/min
カラム温度	40℃
注入量	100μℓ

III 結果と考察

1. 移動相の検討

最初にICP-MSでのヒ素化合物の定量性を見る意味で、4種類のヒ素化合物標準液と4種を混合した標準液をICPネブライザーに直接導入し、カウント数を読みとった。それぞれのカウント数より求めた検量線は、0~0.1mg/lの範囲でいずれも良い直線性を示した(相関係数0.9998~0.9999)。また、各化合物の0.001mg/lにおけるバラツキ, CV%(n=7)は2.0~3.3%の範囲内であった。

次に、HPLCとICP-MSをピークチューブで接続し、移動相にICP-MS測定に影響の少ないと考えられる1mmol硝酸及び井上ら⁹⁾の10mmol TEA/2mmolコハク酸(pH4.45酢酸)を用い検討を行った。用いた分離カラムSEC-W12の分離モードはサイズ排除であり、TEAはイオンペア剤として添加されている。

1mmol硝酸(pH=2.85)を用いた時の、4種混合標準液のクロマトグラムの例を図-2に示した。図のように、最初に溶出されるAs(V)のピークがテーリングを起し、ピークの高さより求めたカウント数によるCV%は0.001mg/lでAs(V)12.3%、DMAA 2.4%、MMAA 8.1%、As(III) 5.5%であり、As(V)のみが10%以上であった。4種類のヒ素化合物標準液と4種を混合した標準液より検量線を求めた結果は、As(V)を除き、よい直線性を示した(相関係数0.9997~0.9999)。As(V)の分離が改善されるかを見るため硝酸の濃度を0.5mmol(pH=3.4)にシフトしたクロマトグラムを求めたが、DMAAとMMAAのピークが重なり、As(V)のピークのテーリング状態も改善されなかった。

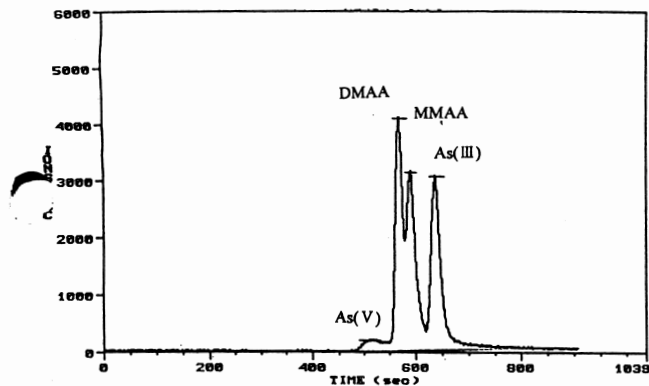


図-2 ヒ素混合標準液のクロマトグラム
各0.01mgAs/l, 移動相1mmolHNO₃, 流量1.0ml/min
カラム温度40℃, 注入量100μl

移動相に10mmol TEA/2mmolコハク酸(pH4.45)を用いた時の4種混合標準液のクロマトグラムを図-3に示した。4種の溶出順序は1mmol硝酸溶液と同様であり、ピーク分離状況は良好であった。0.001mg/lでのバラツキはCV%でAs(V)13.8%、DMAA 8.5%、MMAA 1.1%、As(III)10%であり、移動相に1mmol硝酸を用いた時と同様に、最初に溶出するAs(V)のバラツキが最も大きかった。分離の状況が良かったので、以後の検討には10mmol TEA/2mmolコハク酸(pH4.45)を用いた。

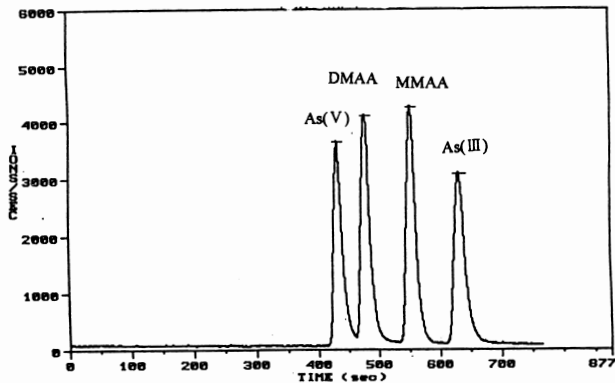


図-3 ヒ素混合標準液のクロマトグラム
各0.01mgAs/l, 移動相10mmolTEA/2mmolコハク酸(pH4.45酢酸)
流量1.0ml/min, カラム温度40℃, 注入量100μl

最初に溶出してくるAs(V)のバラツキが大きかったので、標準液の液性がどのように分離に影響するのかを見た。0.01mg/lの4種混合液を、水溶液(pH6.7)、移動相溶液(pH4.5)、硝酸1mmol(pH3.1)、5mmol(pH2.4)、10mmol(pH2.2)、100mmol(pH1.3)溶液に調製したもののクロマトグラムを比較した。ピーク高さ、保持時間を図-4に示したが、溶出順のAs(V)、DMAA、MMAA、As(III)の順に影響をうける傾向が見られた。最初に溶出するAs(V)は、ピーク高さの低下、保持時間の遅れが大きく、硝酸100mmol溶液では、明確なピークの形状を示さなかった。最後に溶出するAs(III)ではほとんど影響が見られなかった。大きく影響を受けたAs(V)の硝酸100mmol溶液(pH=1.3)を、水酸化ナトリウム溶液でpH値を、2.2、4.6に戻し測定したところ、分離は改善され、はっきりしたピークを示し、ピークの高さも同じpH値のピーク高さの76、87%となり、試料溶液のpH値の影響が大きい事がわかった。

移動相に10mmol TEA/2mmolコハク酸(pH4.45)を用いた時の0.001~0.1mg/lの範囲での検量線を図-5に示したが、良い直線性を示した(相関係数はすべて0.9999以上であった)。

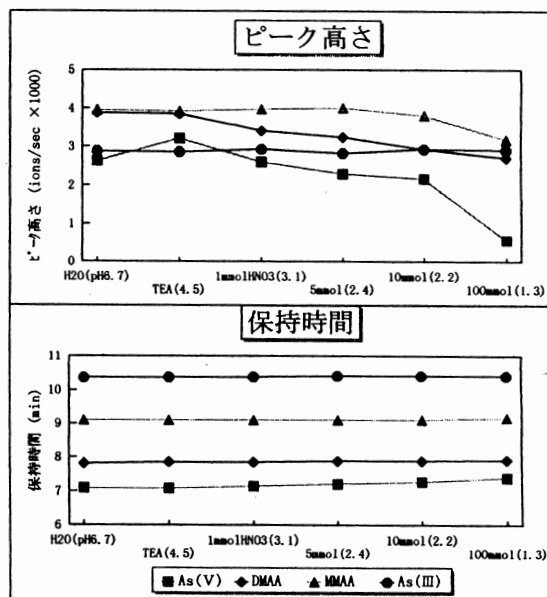


図-4 標準液の液性の違いによるピーク高さ及び保持時間の変化

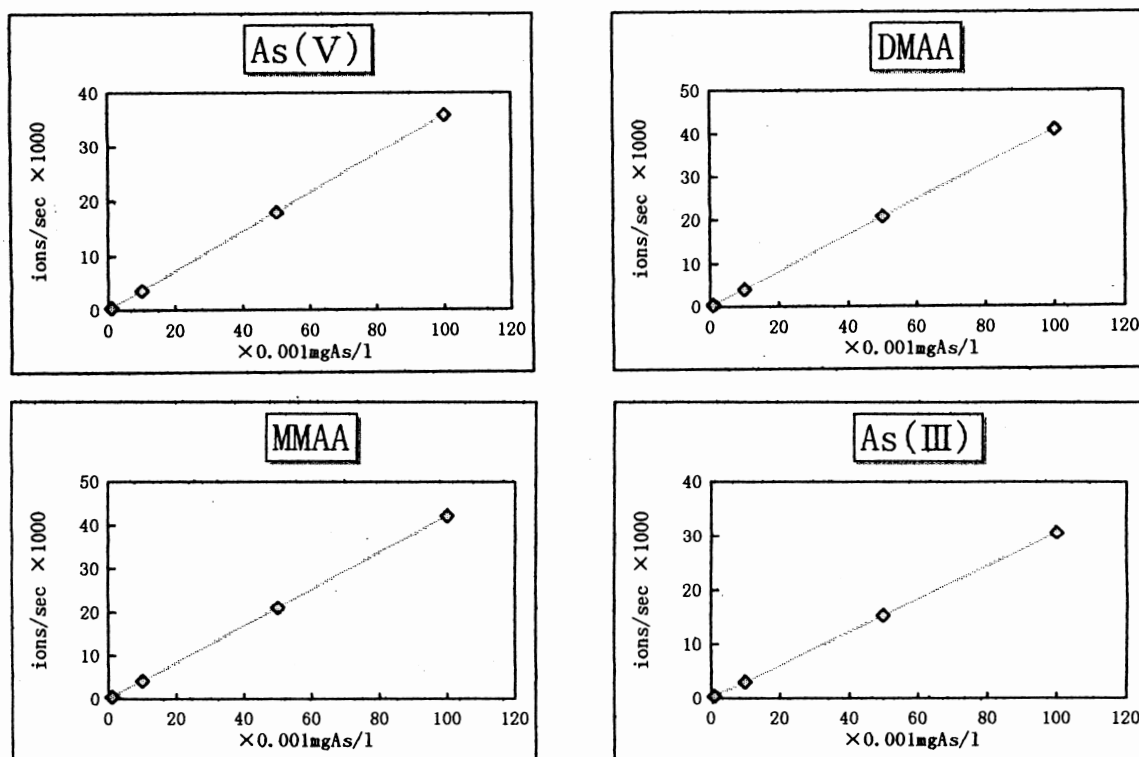


図-5 ヒ素化合物の検量線
 移動相10mmolTEA/2mmolコハク酸 (pH4.45酢酸)
 流量1.0ml/min, カラム温度40℃, 注入量100μl

2. 試料保存の検討

1) 硝酸添加による変化

水道法に基づくヒ素の検査では、試料の保存は「ガラス瓶又はポリエチレン瓶に採取し、試料1ℓにつき硝酸10mlを加えて、速やかに試験する。速やかに試験できない場合は、冷暗所に保存し、1ヶ月以内に試験する。」(フレイムレス-原子吸光度法)と書かれている。ここでは、井水に4種の標準液を添加し、その濃度の経時変化を調べた。

実験は、表-2の性状の井水に4種のヒ素標準液を各0.01mg/ℓとなるように添加し、硝酸の濃度として0mmol (pH7.2), 10mmol (pH2.25), 100mmol (pH 1.2) に調製した。容器は1ℓのガラス瓶を用い、保存は、室温保存, 4℃保存 (冷蔵庫)

表-2 添加実験に用いた井水の性状

pH	7.21
EC	0.253mS /cm
色度	4度
濁度	1度
Na	4.6 mg/ℓ
K	0.16mg/ℓ
Ca	5.7 mg/ℓ
Mg	0.50mg/ℓ
Cl	13.5mg/ℓ
Fe	0.04mg/ℓ
As	0.001 mg/ℓ
NO ₃ -N	4.14mg/ℓ
NO ₂ -N	<0.01mg/ℓ
SO ₄	16.3mg/ℓ
F	<0.05mg/ℓ

で行い、0, 1, 2, 5, 9, 19日目にヒ素化合物を測定した。測定時に、4℃保存のものは室温に戻し測定した。0及び10mmol硝酸溶液はそのままHPLCに注入し、100mmol硝酸溶液はpHが低すぎ、分離に影響するため移動相と同じpH4.45に調整し測定した。また、ICP-MSの感度が日により変化するので、同じ酸濃度に調整したヒ素標準液を同時に測定し、そのカウント数の比により変化を求めた。

結果を図-6に示した。硝酸の添加はAs(III)を酸化し減少させ、As(V)を増加させる傾向を示し、それは硝酸の濃度が高くなるにつれ酸化を促進する傾向にあった。室温保存と4℃保存を比較するとその傾向は室温保存の方が顕著であった。有機ヒ素化合物であるDMAA, MMAAは、室温, 4℃保存とも、変化は見られなかった。ヒ素の形態分析をする試料は硝酸を添加せず、冷蔵運搬して速やかに測定しなくてはならない事がわかった。

2) 容器による変化

2.1)と同様に、ポリエチレン瓶とガラス瓶の保存容器の違いによる濃度の変化を調べた。試料は実験2.1)と同じ井水に4種のヒ素標準液、各0.01mg/ℓとなる様に添加したものをを用い、室温保存, 4℃保存 (冷蔵庫)した。0, 1, 2, 5, 9日目における濃度を測定した。2.1)で行った硝酸の添加は行わなかった。結果を表-3に示したが、ポリエチレン瓶とガラス瓶の容器間の差は見られなかった。2.1)の結果と同様室温保存では、As(III)が酸化され減少し、As(V)が増加する傾向が顕著であり、有機ヒ素のDMAA, MMAAの変化は見られなかった。また、表-3にHPLC/ICP-MSによる4種のヒ素化合物の濃度と直接ICP-MSで測定した全ヒ素の測定結果を示した。添加したヒ素量としては、各0.01mg/ℓ, 4種合計0.04mg/ℓとなるはず

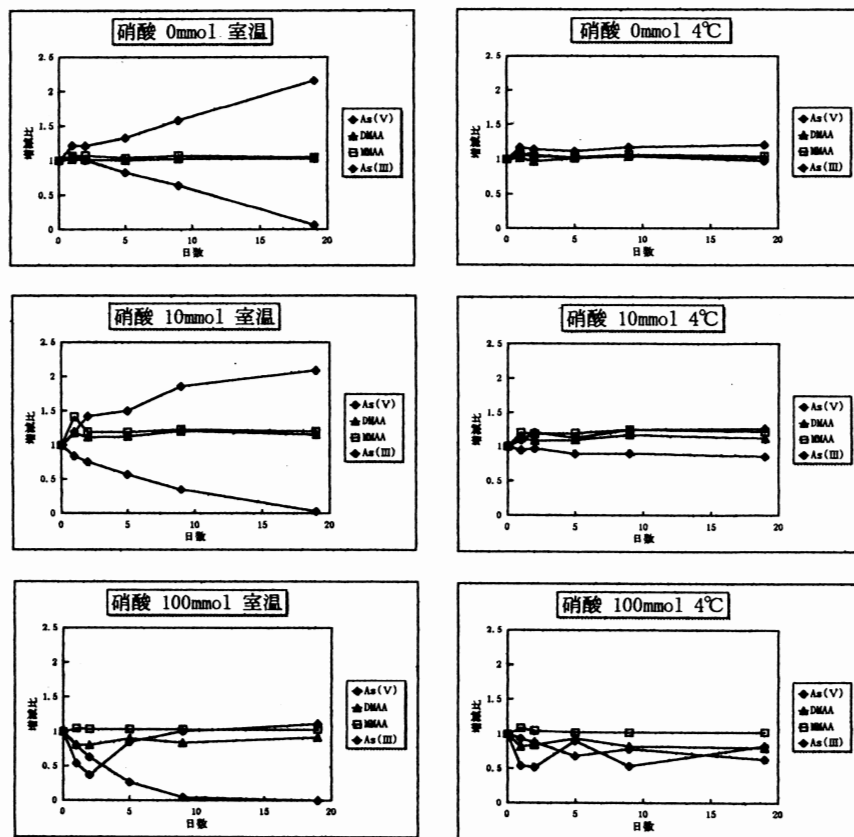


図-6 ヒ素混合物の硝酸濃度による経時変化
濃度0.01mgAs/ℓ

表-3 井水添加試料の経時変化

	日数	0	1	2	5	9
全ヒ素 (T-As)	ガラス室温	51.9	50.5	49.8	48.9	50.0
	ガラス4℃		50.8	50.3	47.8	49.0
	ポリ室温		49.5	50.5	47.9	49.5
	ポリ4℃		48.9	50.4	46.9	49.2
As (V) ①	ガラス室温	15.3	14.8	15.2	22.6	26.2
	ガラス4℃		14.0	14.2	14.7	14.7
	ポリ室温		14.5	15.2	23.4	26.3
	ポリ4℃		14.3	14.3	13.3	13.7
DMAA②	ガラス室温	14.1	12.3	12.1	13.5	14.1
	ガラス4℃		12.1	11.5	12.2	13.0
	ポリ室温		11.9	12.0	12.7	13.9
	ポリ4℃		12.1	12.1	12.9	12.6
MMAA③	ガラス室温	10.7	10.4	9.8	10.0	10.1
	ガラス4℃		8.7	10.0	10.0	10.3
	ポリ室温		10.6	10.0	9.8	10.0
	ポリ4℃		10.8	10.1	9.9	10.1
As (III) ④	ガラス室温	9.8	9.6	9.5	4.3	1.0
	ガラス4℃		9.9	9.7	9.8	9.8
	ポリ室温		9.8	9.4	2.0	0.7
	ポリ4℃		9.6	9.7	9.3	9.7
As合計 ①+②+③+④	ガラス室温	49.9	47.1	46.6	50.4	51.4
	ガラス4℃		44.7	45.4	46.7	47.8
	ポリ室温		46.8	46.6	47.9	50.9
	ポリ4℃		46.8	46.2	45.4	46.1 (μg/ℓ)

全ヒ素はHPLCを接続せず直接ICP-MSで測定した量。
As合計量はHPLC/ICP-MSで4種のAs化合物を分離測定したものの合計量。

であったが、いずれの結果も合計量は約0.05mg/ℓで回収率として125%と高い値となった。HPLC/ICP-MS測定での結果を見ると、溶出順の早いAs (V) 0.015 mg/ℓ, DMAA 0.014mg/ℓと高い値を示し、MMAA, As (III) は、ほぼ0.01mg/ℓに近い値であった。この様に回収率が高くなった原因としては、検量線を作成した標準液は純水で調製し、実験に用いたのは井水という違いであり、この液性の違いがICP-MSのカウント数に影響したのではないかとと思われる。

3. ヒ素を含有する井水の保存時の変化

実際にヒ素を含有する井水を用い、保存時の経時変化を見た。試料は表-4の様な性状であり、全ヒ素として約0.03mg/ℓを含み形態別ではAs (III) は94%, As (V) 6%の割合であり、DMAA, MMAAは検出されなかった。2. 2) の実験と同様に、1ℓガラス瓶を用い、硝酸は添加せず、室温保存、4℃保存(冷蔵庫)で、0, 1, 2, 5, 9日目に濃度を測定した。

結果を表-5に示す。結果は先の実験と同様に、4℃保存の方が変化が小さく、経時的にAs (III) が酸化されAs (V) が増加する傾向も同じであった。しかし、室温放置した場合のAs (III) が酸化されAs (V) となる量は、As (III) の減少量以上に増加した。その結果ICP-MSで測定した全ヒ素量と形態別に求めた合計量は、日数とともに大きな差を示し、全ヒ素量は測定期間中だいたい一定であったが、形態別に求めた合計量は大きく増加した。この原因は不明である。用いた井水の性状はpHと電気伝導度がやや高いが、他の水質主成分項目についても異常な濃度レベルではない。ICP-MS測定時におけるm/z=75に妨害を及ぼす分子

イオンとしてArClが検討されているが、Cl1,000mg/lでもピークが検出されなかったとあり³⁾、用いた井水のCl濃度では妨害は考えられない。

表-4 ヒ素含有井水の性状

pH	8.52
EC	0.653mS/cm
色度	4度
濁度	0度
Na	17.5mg/l
K	6.82mg/l
Ca	19.2mg/l
Mg	6.05mg/l
Cl	8.2mg/l
Fe	0.16mg/l
As	0.032 mg/l
NO ₃ -N	<0.02mg/l
NO ₂ -N	<0.01mg/l
SO ₄	0.2 mg/l
F	0.07mg/l
Zn	0.16mg/l
Mn	0.053mg/l
総アルカリ度	347mg/l
p.pアルカリ度	15.7mg/l
TOC	1.54mg/l

表-5 ヒ素を含有する井水の経時変化

	日数	0 1 2 5 9				
		全ヒ素 (T-As)	ガラス室温	32.0	31.6	32.3
	ガラス4℃		31.5	32.9	32.0	31.6
As (V) ①	ガラス室温	1.7	2.5	4.8	37.5	53.6
	ガラス4℃		1.8	2.2	2.7	3.5
As (III) ②	ガラス室温	25.1	26.2	25.0	6.3	0.1
	ガラス4℃		27.3	26.4	25.6	26.9
As合計	ガラス室温	26.8	28.7	29.8	43.8	53.7
①+②	ガラス4℃		29.1	28.6	28.3	30.4 (μg/l)

IV まとめ

天然水中に主に含まれる4種のヒ素化合物As (V), DMAA, MMAA, As (III) のHPLC/ICP-MSでの一斉分析と試料の保存性について検討した。分離カラムにExcellpak SEC-W12を移動相に10mmol TEM/2mmolコハク酸 (pH4.45酢酸) を用いた時ピークは明確に分離し、0.001~0.1mgAs/lの検量線は相関係数0.9999以上の良い直線性を示した。

試料の保存性を検討した結果、室温ではAs (III) が酸化されAs (V) となる傾向にあり、さらに、硝酸の添加により、より酸化が促進される事がわかった。それらと比較しDMAA, MMAAの変化は小さかった。容器として、ガラス瓶とポリエチレン瓶を比較したが保存性に関して差は見られなかった。形態別に測定する場合は、試料水に何も添加せず、測定まで低温に保存し、速やかに測定しなければならない。

V 文献

- 1) 日本水道協会 (1993) 上水試験方法解説, 331.
- 2) 田中茂, 金子正秀, 今野芳幸, 橋本芳一 (1983) 還元気化原子吸光法による天然水中のヒ素化合物の分別定量, 分析化学, Vol.32, 535-541.
- 3) Yasuyuki Shibata and Masatoshi Morita, (1989), Exchange of Comments on Identification of Arsenic Species in a Dogfish Muscle Reference Material for Trace Elements, Anal. Chem. 61, 2116-2118.
- 4) 井上嘉則, 川端克彦 (1992) ICP-MSによるヒ素化合物の形態別測定, 第9回イオンクロマトグラフィー討論会講演要旨集, 64-65.
- 5) 井上嘉則, 川端克彦, 高橋博光, 圓藤吟史 (1995) イオンクロマトグラフィー/誘導結合プラズマ質量分析法を用いた尿中無機及び有機ヒ素化合物の定量, 分析化学, Vol.44, No. 3, 203-208.
- 6) 石黒靖尚, 大野健治, 鳥羽峰樹, 長瀬誠, 近藤紘之 (1996) 福岡県南部地域の地下水中のヒ素の形態, 水環境学会誌, Vol.19, No.3, 243-246.