

## 液体クロマトグラフ-誘導結合プラズマ質量分析装置を用いた

### ミネラルウォーター類中の六価クロム分析法の性能評価

高梨 麻由<sup>a</sup>, 田原 正一<sup>b</sup>, 飯田 憲司<sup>a</sup>, 貞升 友紀<sup>a</sup>

六価クロム（以下、Cr(VI)とする）は毒性を有する金属元素であり、食品衛生法においてミネラルウォーター類に対し基準値（0.02 mg/L）が規定されている。本研究では液体クロマトグラフ-誘導結合プラズマ質量分析装置（以下、LC-ICP-MSとする）を用いた分析法について検討し、その性能を評価して日常検査への適用の可否を検討した。都内で流通しているミネラルウォーター3種類にそれぞれCr(VI)を添加し、食品中の有害物質等に関する分析法の妥当性ガイドラインに則り性能評価を行った結果、選択性があり、真度100~108%、併行精度2.8%以下、室内精度5.3%以下でいずれも目標値を達成した。以上より、本法は日常検査において有用な方法であると示唆された。

**キーワード**：クロム，六価クロム，Cr(VI)，ミネラルウォーター，液体クロマトグラフ-誘導結合プラズマ質量分析装置，LC-ICP-MS

#### はじめに

クロム（以下、Crとする）は原子番号24の複数の形態をもつ金属元素で、安定した形態として金属クロム（以下、Cr(0)とする）、三価クロム（以下、Cr(III)とする）、Cr(VI)が知られている。Cr(0)はステンレス等合金の成分に、Cr(III)は皮革なめし剤やサプリメント等に、Cr(VI)はめっき、顔料等工業的に用いられている。Cr(0)およびCr(III)は国際がん研究機関（International Agency for Research on Cancer; IARC）の発がん性評価や環境省における化学物質の環境リスク評価で、ヒトへの健康リスクは少ないとされている。一方で、Cr(VI)については毒性が強く、IARCにおいて「ヒトに対して発がん性がある」と評価されている<sup>1)</sup>。

自然界に存在するCrのほとんどはCr(III)であり、Cr(VI)は天然にはほとんど存在せず、主に人為的な要因で発生する<sup>2)</sup>。そのため、飲料水に存在するCr(VI)は家庭や工場等からの排水による人為的な汚染であると推定されている<sup>3)</sup>。また、2000年以降には地下水や表層水からCr(VI)の検出事例が報告されている<sup>4)</sup>。

我が国では食品衛生法において、ミネラルウォーター類の規格基準としてCr(VI)の基準値が規定されている<sup>5)</sup>。平成26年の規格基準一部改正<sup>6)</sup>で示されたCr(VI)の分析法は、ICP-MSでカドミウムやヒ素等の金属元素と一斉に分析を行う方法であった<sup>7)</sup>。この分析法はCr(VI)のみでなくCr(III)等も含めた総Crを測定する方法であり、厳密には規格に適合していることの判定根拠となる分析値を得ることができない。しかし、令和3年の規格基準一部改正<sup>8)</sup>に伴った分析法改正により、Cr(VI)のみをイオンクロマトグラ

フで測定する分析法が新たに通知された<sup>9)</sup>。ただし、この通知法どおりにCr(VI)を測定するためには、イオンクロマトグラフのポストカラムに10 mもの専用の反応コイルが必要である<sup>9,10)</sup>。

そこで、我々は感度や選択性等がイオンクロマトグラフと同等以上の性能を有していると考えられるLC-ICP-MSを用いたCr(VI)分析法を検討した。LC-ICP-MSは、LCで価数の異なる金属類を分離し、ICP-MSで目的元素を測定することが可能な装置であり、従前より水道水や玩具等に含まれるCr(VI)の分析に用いられている<sup>11-15)</sup>。しかし、ミネラルウォーター類を対象として分析法の性能評価を行った報告は、国内においてみられない。

そこで本研究では、LC-ICP-MSを用いたミネラルウォーター類中のCr(VI)分析法について検討し、その性能を評価して日常検査への適用の可否を検討した。

#### 実験方法

##### 1. 試料

都内で流通しているミネラルウォーター3種類（軟水2試料および硬水1試料）を試料とした（Table 1）。なお、ミネラルウォーターの軟水および硬水の定義については、Taylorの分類<sup>16)</sup>を参考とした。

##### 2. 試薬等

超純水：超純水製造装置で製造したもの。  
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム・二水和物（EDTA-2Na）：試験研究用（株）同仁化学研究所製。

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター食品化学部

硝酸アンモニウム：試薬特級 富士フィルム和光純薬（株）製。

アンモニア水：原子吸光分析用 関東化学（株）製。

Cr 標準液：100 mg/L 試験研究用 富士フィルム和光純薬（株）製。

30 mmol/L 硝酸アンモニウム/5 mmol/L EDTA-2Na 溶液 (pH 7.0)：EDTA-2Na 1.86 g と硝酸アンモニウム 2.40 g を秤量し、超純水約 900 mL に溶かした後、pH メーターで pH を確認しながら 10 倍希釈したアンモニア水を滴下し pH 7.0 に合わせた。その後、超純水で 1 L に定容し、0.45  $\mu$ m フィルターでろ過した。

### 3. 器具及び装置

器具は全てプラスチック製のものをを用いた。

超純水製造装置：Milli-Q Integral MT5（メルク（株）製）。

pH メーター：pH・イオンメータ HM-42X（東亜ディーケーケー（株）製）。

LC-ICP-MS：LC 部 Agilent Technologies 1260 Infinity II バイオイナート LC システム，ICP-MS 部 Agilent Technologies 7900 ICP-MS（いずれも、アジレント・テクノロジー（株）製）。

### 4. 試験溶液の調製

試料を超純水で適宜希釈し、試験溶液とした。

### 5. 検量線

Cr(VI)標準液（100  $\mu$ g/mL）を超純水で希釈し、0.5 ng/mL～10 ng/mL の範囲で検量線を作成した。

### 6. 測定条件

既報<sup>12-15)</sup>を参考に測定条件を決定した。

[LC 条件] ガードカラム：Agilent Bio SAX, NP5, PK guard（5  $\mu$ m, Non-Porous, 4.6 $\times$ 50 mm），分離カラム：Agilent Bio SAX, NP5, PK（5  $\mu$ m, Non-Porous, 4.6 $\times$ 250 mm），移動相：30 mmol/L 硝酸アンモニウム/5 mmol/L EDTA-2Na 溶液（pH 7.0），流速：0.4 mL/min，注入量：100  $\mu$ L。

[ICP-MS 条件] RF 出力：1550 W，ネブライザガス：Ar, 1.07 L/min，コリジョンガス：He, 4.3 mL/min，測定質量数：Cr,  $m/z$  52。

### 7. 定量

6. の条件で試験溶液及び検量線を測定し、得られたカウントをもとに計算し定量した。

### 8. 性能評価

Cr(VI)標準液（100  $\mu$ g/mL）を 0.02 mg/L（基準値）となるよう添加した試料を用いた。性能評価は、食品中の有害

物質等に関する分析法の妥当性確認ガイドライン<sup>17)</sup>に従い実施した。

## 結果および考察

### 1. 検量線および分析機器の検出限界

Cr(VI)について分析した結果、Fig. 1 のクロマトグラムを得た。Cr(III)と Cr(VI)のピークはそれぞれ 6 分と 13 分に現れ完全に分離したため、本条件で分析を行うこととした (Fig. 1)。

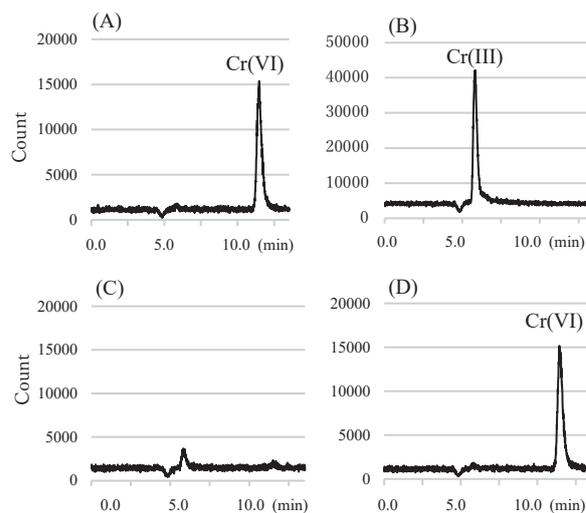


Fig.1 Typical Chromatograms

- (A) Standard solution of Cr(VI) (1 ng/mL)
- (B) Standard solution of Cr(III) (1 ng/mL)
- (C) Mineral water product
- (D) Mineral water product fortified with Cr(VI) (1 ng/mL)

検量線は 0.5 ng/mL～10 ng/mL の範囲で決定係数  $r^2$  が 0.999 以上と、良好な直線性が得られた (Fig. 2)。よって、この検量線範囲で定量を行うこととした。

また、0.5 ng/mL の Cr(VI)標準溶液の SN 比は 10 以上を満たしたことから、この濃度を分析機器の検出限界とした。

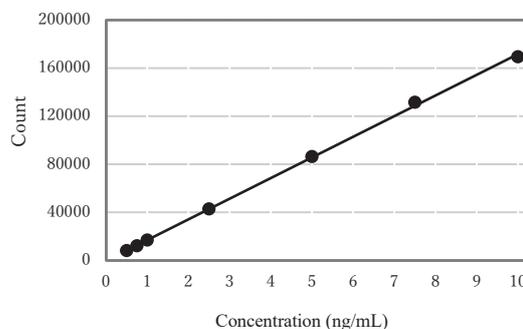


Fig.2 Calibration Curve of Cr(VI) by LC-ICP-MS

## 2. 希釈倍率の検討

Cr(VI)の基準値である 0.02 mg/L (20 ng/mL) となるよう Cr 標準液を添加した各試料について、検量線の範囲に入るよう超純水で 4 倍希釈を行い測定した。その結果、水 1, 2 はそれぞれ回収率 100, 104%と良好な結果が得られた。一方、水 3 は 75.4%と回収率が低かった (Table 1)。

その原因は、硬水である水 3 は他の試料と比較して含まれるカルシウムやマグネシウム濃度が高く、4 倍希釈では ICP-MS 測定時にそれらによるイオン化干渉が起き<sup>18)</sup>、Cr(VI)の回収率が低くなったと考えられた。そこで、回収率を改善するため、更に超純水で希釈することとした。検討で用いた硬水の硬度は 300 mg/L であったことから、検量線の範囲内かつ、本研究で用いた軟水を希釈した時と同程度の硬度になるよう希釈倍率を 20 倍とした。その希釈した試料の測定結果は、回収率 97.3%となり 4 倍希釈の結果と比較して向上した (Table 1)。

以上より、硬水に関しては希釈倍率を上げ、カルシウムやマグネシウム等による干渉の影響を軽減することで、測定可能であることが示唆された。

Table 1. Recovery of Cr(VI) from Mineral Water Products

Products	Water hardness (mg/L) <sup>a</sup>	Dilution ratio	Recovery (%) <sup>b</sup>
Water 1	30	4	100
Water 2	10-80	4	104
Water 3	304	4	75.4
		20	97.3

<sup>a</sup> Label value.

<sup>b</sup>  $n=2$ , Cr(VI) was fortified at 0.02 mg/L.

## 3. 性能評価

### 1) 選択性

ブランク試料を今回の試験法に従い分析した結果、定量を妨害するピークが無いことを確認した。よって、性能評価を行うにあたり、特に問題がないことがわかった。

### 2) 真度および精度

2. の結果より、水 1, 2 は 4 倍希釈、水 3 は 20 倍希釈した試験溶液を用い、ガイドラインに従い性能評価を行った。結果は真度 100~108%, 併行精度 2.8%以下、室内精度 5.3%以下で、いずれも目標値を達成した (Table 2)。

よって、本法は、ミネラルウォーター類の規格基準における Cr(VI)分析法として、十分な性能を有していることが示された。

一般に流通しているミネラルウォーター類には、より硬度の高いものや炭酸を含むものもある。今後はそれらについても本法適用の可否を検討する必要があると考える。

## ま と め

LC-ICP-MS を用いて、ミネラルウォーター類を対象とした Cr(VI)分析法の性能評価を行った結果、いずれの試料においても妥当性確認ガイドラインの目標値を満たした。よって、本法は日常検査で用いるに足る、十分な性能を有していることが示された。

既報<sup>10,19)</sup>にあるように、ミネラルウォーター類に含まれる Cr(VI)が基準値を超える濃度で検出する可能性は低いと考えられる。しかし、工業的に製造された Cr(VI)の管理が不適切な場合に、ミネラルウォーターの原水が汚染され、その原水を使用し製造された製品で Cr(VI)を検出し、食の安全が脅かされる可能性は否定できないため、分析法の確立は重要である。今後も食の安心安全を守るための一助として、Cr(VI)分析法の検討を実施していく。

Table 2. Validation Result of Cr(VI) in Mineral Water Products

Products	Water hardness(mg/L) <sup>a</sup>	Dilution ratio	Turueness(%)	RSD <sub>r</sub> (%) <sup>b</sup>	RSD <sub>WR</sub> (%) <sup>c</sup>
Water 1	30	4	104	1.8	3.5
Water 2	10-80	4	108	1.5	5.3
Water 3	304	20	100	2.8	2.8

$n=2 \times 5$  days  $\times$  1 analyst, Cr(VI) was fortified at 0.02 mg/L.

<sup>a</sup> Label value.

<sup>b</sup> RSD<sub>r</sub>: Repeatability.

<sup>c</sup> RSD<sub>WR</sub>: Within-laboratory reproducibility.

## 付 記

本研究の概要は第118回日本食品衛生学会年会、2022年11月、において発表した。

## 文 献

- 1) 内閣府食品安全委員会：ファクトシート クロム,  
[https://www.fsc.go.jp/sonota/factsheets/130617\\_chromium.pdf](https://www.fsc.go.jp/sonota/factsheets/130617_chromium.pdf) (2023年9月12日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 2) ATSDR: Toxicological Profile for Chromium,  
<https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp7.pdf> (2023年9月12日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 3) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of chromium in food and drinking water, *EFSA Journal*, **12**(3), 3595, 2014.
- 4) Paul B Tchounwou, Clement G Yedjou, Anita K Patlolla, and Dwayne J Sutton.: Heavy metal toxicity and the environment, Andreas Luch, *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, **3**, 133–136, 2012, Springer Basel, Schweiz.
- 5) 厚生労働省：厚生省告示第370号、食品、添加物等の規格基準 D.各条 清涼飲料水, 昭和34年
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長：食安発1222第1号、乳及び乳製品の成分規格に関する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について、平成26年12月22日。
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長：食安発1222第4号、清涼飲料水等の規格基準の一部改正に係る試験法について、平成26年12月22日。
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長：生食発0629第4号、食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について（清涼飲料水の規格基準の一部改正）、令和3年6月29日。
- 9) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長：生食発0831第11号、「清涼飲料水等の規格基準の一部改正に係る試験法について」の一部改正について、令和3年8月31日。
- 10) 片岡洋平, 渡辺敬浩, 林 恭子, 他：食衛誌, **58**, 275–280, 2017.
- 11) 大阪市水道局：IC-ICP/MS 法を用いた水道試料中の六価クロムのスペシエーション分析,  
<https://www.city.osaka.lg.jp/suido/cmsfiles/contents/0000245/245422/02-H22kansai.pdf> (2023年9月12日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 12) アジレント・テクノロジー（株）会社：六価クロム化合物測定方法としての高速液体クロマトグラフ-誘導結合プラズマ質量分析法,  
<https://www.chem-agilent.com/appnote/pdf/LC-201902WN-001.pdf> (2023年9月12日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 13) アジレント・テクノロジー（株）会社：イオンクロマトグラフィー(IC)ICP-MSによる、環境試料中のクロムのスペシエーション分析,  
<https://www.chem-agilent.com/pdf/00052941.pdf> (2023年9月12日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 14) アジレント・テクノロジー（株）会社：LC-ICP-MS3を用いた、欧州安全性規格・玩具 EN71-3 分析に準拠するための玩具中の3価および6価クロムの分析,  
[https://www.chem-agilent.com/appnote/pdf/low\\_5991-2878JAJP.pdf](https://www.chem-agilent.com/appnote/pdf/low_5991-2878JAJP.pdf) (2023年9月12日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 15) アジレント・テクノロジー（株）会社：LC(IC)-ICP-MSを用いたCr(III)とCr(VI)のスペシエーション分析,  
[https://www.chem-agilent.com/pdf/low\\_5990-9366JAJP.pdf](https://www.chem-agilent.com/pdf/low_5990-9366JAJP.pdf) (2023年9月12日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 16) Taylor, E.W.: *The examination of waters and water supplies*, **7th ed.**, 1958, J. & A. Churchill, London.
- 17) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長：生食発0831第17号、食品中の有害物質等に関する分析法の妥当性確認ガイドライン、令和3年8月31日。
- 18) 田尾博明, 飯田 豊, 稲垣和三, 高橋純一, 中里哲也：分析化学実技シリーズ 機器分析編・17 誘導結合プラズマ質量分析, 63–91, 2015, 共立出版, 東京
- 19) 片岡洋平, 竹内温教, 小林 尚, 他：食衛誌, **61**, 72–76, 2020.

**Single-laboratory Validation Study on an Analytical Method Using  
Liquid Chromatograph-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer  
for Hexavalent Chromium in Mineral Water Products**

Mayu TAKANASHI<sup>a</sup>, Shoichi TAHARA<sup>a</sup>, Kenji IIDA<sup>a</sup>, and Yuki SADAMASU<sup>a</sup>

Hexavalent chromium (Cr(VI)) is a toxic metallic element, with a standard value of 0.02 mg/L set for mineral waters under the Food Sanitation Act of Japan. This study investigated an analytical method using liquid chromatograph-inductively coupled plasma mass spectrometer (LC-ICP-MS), evaluated its performance, and determined its applicability for routine testing. Three types of mineral water products, each with added Cr(VI) and distributed in Tokyo, were used to evaluate its performance of Cr(VI)'s under the Guidelines for Validation of Analytical Methods for Testing Hazardous Substances in Food. The results revealed selectivity and achieved the target values of trueness of 100%–108%, repeatability of  $\leq 2.8\%$ , and intra-laboratory reproducibility of  $\leq 5.3\%$ . These results indicate the suitability of the proposed method for routine testing.

**Keywords:** chromium, hexavalent chromium, Cr(VI), mineral water products, liquid chromatograph-inductively coupled plasma mass spectrometer, LC-ICP-MS

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan