

報 文

HPLC-ICPMS を用いた Species-unspecific 及び Species-specific 同位体希釈分析法による セレンイースト標準物質中のセレノメチオニンの定量

山本 貴雄¹, 向井 達也¹, 鈴木 美成¹, 松川 岳久², 篠原 厚子², 古田 直紀^{®1}

セレンイースト標準物質 (SELM-1, National Research Council of Canada 製) 中のセレノメチオニン (SeMet) の定量を行い, 抽出手法の検討を行った. また高速液体クロマトグラフィーをオンラインで接続した誘導結合プラズマ三次元四重極質量分析計 (HPLC-ICP3DQMS) を用いた species-unspecific 及び species-specific な同位体希釈分析法 (isotope dilution analysis, IDA) により SELM-1 中の SeMet の定量を行った. そして, 結果を比較することで 2 種類の IDA の評価を行った. SeMet の抽出には, Lipase Type VII (Sigma Chemicals, St. Luis, MO, USA) 及び Protease Type XIV (Sigma Chemicals, St. Luis, MO, USA) を用いて 24 時間酵素分解を行う方法が, 適していることが確認された. ただし, 前処理操作中に SeMet の分解が確認された. SELM-1 中の SeMet の測定値は, species-unspecific IDA が $3040 \pm 77 \mu\text{g g}^{-1}$, species-specific IDA が $3154 \pm 82 \mu\text{g g}^{-1}$ であり, 保証値 ($3448 \pm 146 \mu\text{g g}^{-1}$) とそれぞれ 4σ , 2σ 以内で一致したことから, 安定同位体を濃縮した化合物が合成できる場合は species-specific IDA を用いる方がよいと結論づけた.

1 緒 言

Se は人体にとって必須微量元素であり, 様々な化合物として体内に存在する¹⁾. Se は至適濃度範囲が狭く, 摂取上限量が成人男性で $450 \mu\text{g day}^{-1}$, 成人女性で $350 \mu\text{g day}^{-1}$ と厚生労働省が基準を定めている²⁾. 欠乏すると克山病といった心疾患や動脈硬化を起し, 過剰摂取により脱毛や爪の変形などの中毒症状が発症する. 生体での至適濃度範囲内では, 細胞の抗酸化作用, 水銀や白金錯体であるシスプラチンといった重金属の毒性軽減, といった役割を Se は担っている³⁾⁴⁾. 近年では, 人体に毒性の少ないセレノメチオニン (selenomethionine, SeMet) (Fig. 1) の形態で Se を濃縮した Se サプリメントにも注目が集まっている.

また, 誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) で Se を測定する際には Ar や Br を含んだ分子イオンによるスペクトル干渉が多く存在する. そのため, 三次元四重極質量分析計の衝突誘起解離 (CID, collision induced dissociation) 及び質量選択的共鳴周波数 (FNF, filtered noise field) を用いることで Ar や Br を含んだ分子イオンによるスペクトル干渉を除去し, より正確な同位体比測定が可能となる⁵⁾. Se を測定する場合には, $^{40}\text{Ar}_2^+$ によるスペクトル干渉を取り

除くことで, 同位体存在率が最大である ^{80}Se (49.61 %) を測定することが可能となる⁶⁾⁷⁾. そして, 同位体希釈分析法 (isotope dilution analysis, IDA) を用いることで, 精度及び確度の高い測定が可能になると考えられる. Fig. 2 に IDA の基本概念を示す⁸⁾. 測定した同位体比 R を式に代入することにより, 測定目的元素の原子数または物質量を求めることが可能である⁹⁾¹⁰⁾.

化学形態別分析に IDA を用いる場合には, 大きく species-unspecific IDA と species-specific IDA の二つに分けられる. species-unspecific IDA は試料が分離カラムを通過した後にスパイクを一定流量で加えるので, post-column IDA とも呼ばれている^{11)~13)}. 一方, species-specific IDA は, 試料に測定対象と同じ化学形態のスパイクを直接混合させ

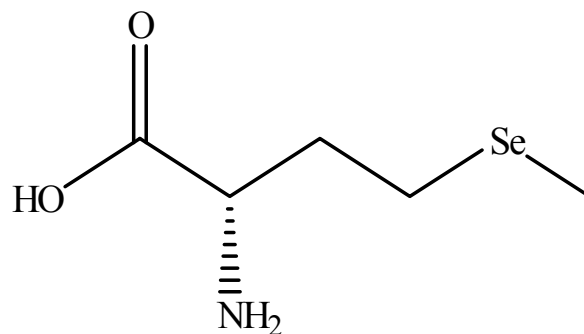


Fig. 1 Structure of selenomethionine

® E-mail: nfuruta@chem.chuo-u.ac.jp

¹ 中央大学理工学部応用化学科: 112-8551 東京都文京区春日 1-13-27

² 順天堂大学医学部: 113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1

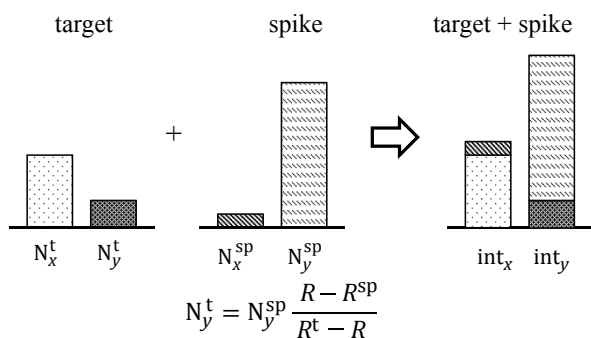


Fig. 2 Schematic illustration of IDA procedure and equation

Here, N_x^t , Abundance of isotope x in target; N_y^t , Abundance of isotope y in target; N_x^{sp} , Abundance of isotope x in spike; N_y^{sp} , Abundance of isotope y in spike; int_x , intensity of isotope x ; int_y , intensity of isotope y ; R^{sp} , Isotope ratio in spike = N_x^{sp}/N_y^{sp} ; R^t , Natural isotope ratio = N_x^t/N_y^t ; R , Isotope ratio in target + spike = int_x/int_y .

る手法である。species-unspecific IDA では試料の化学形態に依存しない定量が可能であるという利点が存在するが、一方で分離カラム内での試料の吸着がある場合には正確な定量が行えないという欠点も存在する¹⁴⁾。つまり、species-specific IDA を用いると分離カラム内での試料とスパイクの吸着率が等しいため、より正確な定量が行えると考えられる。しかし、一般的に安定同位体を濃縮した特定の化学種を手に入れることが困難であるために、汎用性の高い species-unspecific IDA を用いて Se を測定した論文が多く発表されている^{15)~18)}。

本研究ではセレンイースト標準物質 (SELM-1, National Research Council of Canada 製, NRC) の Se 全量の測定及び SeMet を, Delatour ら¹⁹⁾の方法を参考に行った塩酸分解法による抽出と, Reyes ら²⁰⁾の方法を参考に行った酵素分解法による抽出の比較を行い, 試料抽出の方法の検討を行った。また, SeMet の標品を用いた species-specific な IDA により, スパイクに用いる質量数 82 の Se を濃縮した SeMet (⁸²SeMet) の正確な濃度決定を行った。そして, 酵素分解法を用いて抽出した SELM-1 中の SeMet を誘導結合プラズマ三次元四重極質量分析計 (inductively coupled plasma-three dimensional quadrupole mass spectrometry, ICP3DQMS) を用いた species-unspecific IDA 及び species-specific IDA の 2 種類の手法で測定を行い, 結果の比較を行うことで評価を行った。

2 装置及び試薬

2.1 試薬

測定試料として SELM-1 を用いた。全 Se 量の定量のための酸分解には硝酸 (70 %, 電子工業用, Kanto Chemical

Table 1 Experimental conditions of ICP3DQMS

RF Power	1400 W
Plasma Ar flow	14 L min ⁻¹
Auxiliary Ar flow	1.2 L min ⁻¹
Nebulizer Ar flow	1.3 L min ⁻¹
Buffer gas	He
Number of scan	10
Isotopes monitored	80, 82
CID voltage	0.035 V
Trapping time	100 ms

Co., Inc. 製, Tokyo, Japan) 及び過酸化水素 (30 %, 電子工業用, Kanto Chemical Co., Inc. 製, Tokyo, Japan) を用い, 酵素分解法には Lipase VII (Sigma Chemicals 製, St. Luis, MO, USA) 及び Protease, Type XIV (Sigma Chemicals 製, St. Luis, MO, USA) を用いた。また, スパイク濃度を正確に求めるために, SeMet (純度 99.4 %, Sigma Chemicals 製, St. Luis, MO, USA) を使用した。そして, SELM-1 中の Se 全量分析及び species-unspecific IDA に用いる ⁸²SeO₃²⁻ スパイクは, 質量数 82 の Se を濃縮した金属 Se (⁷⁴Se 0.12 %, ⁷⁶Se 0.17 %, ⁷⁷Se 0.15 %, ⁷⁸Se 0.52 %, ⁸⁰Se 1.85 %, ⁸²Se 97.19 %, Oak Ridge National Laboratory 製, TN, USA) を硝酸に溶かして調製した。濃度は 76.0 ± 2.7 μg ⁸²Se g⁻¹ である。species-specific IDA に用いる ⁸²SeMet スパイクは, 質量数 82 の Se を濃縮した金属 Se (⁷⁴Se 0.00 %, ⁷⁶Se 0.08 %, ⁷⁷Se 0.02 %, ⁷⁸Se 0.03 %, ⁸⁰Se 0.15 %, ⁸²Se 99.72 %, Eurisotope 製, GifSur-Yvette, France) を用いて合成した。

移動相の調製には, 水酸化テトラメチルアンモニウム (TMAH, 25 %), マロン酸, 1-ブタンスルホン酸ナトリウム (98 %) 及びメタノール (99.9 %), 硝酸 (70 %) 及びアンモニア (29 %) を用いた。

2.2 装置

高速液体クロマトグラフィー誘導結合プラズマ三次元四重極質量分析計 (HPLC-ICP3DQMS) を用いた Se 化学形態別分析には, PU-1580i (JASCO Cooperation 製, Tokyo, Japan) を用いて試料及び移動相の送液を行った。カラムに逆相カラム (LiChrosorb RP-18, 250 × 4.6 mm I.D., 粒径 5 μm, Seibersdorf 製, Austria) を用い, また species-unspecific IDA のスパイクの送液には MP710i (GL Sciences 製, Tokyo, Japan) を用いた。元素分析にはオンラインで高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と接続した P-5000 型 ICP3DQMS (Hitachi High-Technologies Co. 製, Tokyo, Japan) を用いた。ICP3DQMS の測定条件を Table 1 に示す。

2.3 HPLC 条件

移動相には水酸化テトラメチルアンモニウムが 8 mM,

マロン酸が 4 mM, 1-ブタンスルホン酸ナトリウムが 2.5 mM 及びメタノールが 0.05 % になるように混合し, 硝酸及びアンモニアで pH を 4.5 に調整した混合イオン対試薬を用いた²¹⁾. species-unspecific IDA では試料 100 μL , 移動相を 0.9 mL min^{-1} , スパイクを 0.1 mL min^{-1} で導入し, 測定を行った. species-specific IDA では試料 100 μL , 移動相を 1.0 mL min^{-1} で導入し, 測定を行った.

2.4 ⁸²SeMet 合成方法

SeMet の標品を用いた ⁸²SeMet の合成は既報²²⁾に従った. ここでは簡単に説明する. 金属 Se を懸濁させた脱水テトラヒドロフラン (30 mL) に 2.8 % メチルリチウムを含むジエチルエーテル溶液 (6 mL) を加え, すべての金属粉が溶解するまで室温で攪拌した. この溶液に, 4 % (S)-2-アミノ-4-プロモブタン酸臭化水素酸塩/脱水エタノール溶液 (10 mL) を添加したのち 1 時間攪拌を行った. 反応混合物を陽イオン交換カラムにて精製したのち, 水-エタノール系で再結晶を行い ⁸²SeMet を得た.

2.5 全 Se 量分析

試料中の Se とスパイク中の Se の物質質量比が 3 : 1 となるように SELM-1 0.01 g に ⁸²SeO₃²⁻ スパイク (76.6 $\mu\text{g Se g}^{-1}$, Oak Ridge National Laboratory 製) 0.1 g を加えた. さらに, 70 % 硝酸 400 μL , 30 % 過酸化水素 200 μL を加えてマイクロ波分解を行った. 分解後の溶液を 100 g になるように超純水で希釈して測定試料とした. そして, flow injection analysis (FIA)-ICP3DQMS で ⁸⁰Se/⁸²Se の比を測定した. 以下の測定に関しても測定同位体比は ⁸⁰Se/⁸²Se である.

2.6 ⁸²SeMet スパイクの濃度決定

一般的に, スパイクの濃度は, スパイクに既知濃度の元素の溶液を加えた後に酸などを用いて分解し, 同位体比を ICPMS 等で測定することで求める. しかし, 今回の species-specific IDA に用いる ⁸²SeMet は合成したものであり, Se を含んだ不純物の存在が考えられる. したがって, 精確に ⁸²SeMet のみの濃度を求める必要がある. そこで, ⁸²SeMet スパイク溶液と SeMet の標品の Se 物質質量比が 1 : 3 となるように, ⁸²SeMet スパイク溶液 0.1 g に SeMet 標準溶液 (101 $\mu\text{g Se g}^{-1}$) を 0.0989 g を加えた. その後, 超純水で 10 g に希釈して測定試料とした. 逆相カラムを通すことで Se を含有する不純物を分離し, ⁸²SeMet のみの濃度を算出することが可能となる.

2.7 SeMet の抽出

2.7.1 塩酸分解法 テフロン製容器にセレンイースト標準物質 200 mg を入れ, そこに 6 mol L⁻¹ 塩酸 8 mL を

加えて 110 °C のホットプレート上で 24 時間加熱分解を行った. 分解後の試料を 2880 \times g で 10 分間遠心分離し, 上澄み液を取り出した. これらの上澄み液を 0.45 μm フィルターで汙過し, 汙液のうち 1 g を混合イオン対試薬で 20 g に希釈し, ⁸²SeO₃²⁻ スパイクを用いる species-unspecific IDA により測定を行った.

2.7.2 酵素分解法 SELM-1 0.2 g に Lipase VII 0.01 g, Protease, Type XIV 0.02 g, ⁸²SeMet 2.0 g 及び超純水 3 mL を加えて 37 °C に設定した恒温振とう機内で 24 時間酵素分解を行った. 分解後の溶液を 4000 \times g で遠心分離し, 上澄みを採取した. その上澄みを 0.45 μm フィルターで汙過し, 汙液のうち 1 g を混合イオン対試薬で 20 g に希釈して species-specific IDA 用測定試料とした. なお, species-unspecific IDA 用のサンプルは上記と同じ条件で, ⁸²SeMet を加えずに調製を行った.

3 結果及び考察

3.1 全 Se 量分析

SELM-1 中の全 Se 量分析の結果は測定値が 1955 \pm 48 $\mu\text{g g}^{-1}$ ($n = 3$) であり, 保証値の 2059 \pm 64 $\mu\text{g g}^{-1}$ と 1 σ 以内で一致した. したがって, 今回の Table 1 に示した測定条件は適切であったといえる. また, カナダ国立研究機構 (National Research Council of Canada, NRC) から七つの研究機関で行った全 Se 量の分析結果が 1836 ~ 2145 $\mu\text{g g}^{-1}$ であったので²³⁾, 既報の値と比較しても遜色のない結果であった.

3.2 ⁸²SeMet スパイクの濃度決定

SeMet の標品を用いた species-specific な IDA により定量を行った. ⁸²SeMet スパイク中の ⁸²Se 元素濃度は 31.0 \pm 0.9 $\mu\text{g } ^{82}\text{Se g}^{-1}$ (%RSD: 2.9 %, $n = 3$) であった. 今回, species-specific IDA での SELM-1 中の SeMet の濃度はこちらの値を用いて算出することとした.

3.3 SeMet 前処理方法の比較

塩酸分解法により前処理を行った SELM-1 中の SeMet を species-unspecific IDA で定量したクロマトグラムを Fig. 3 a に示す. 保持時間 7.9 分に観測されているピークが SeMet である. また, 保持時間 4.2 分の亜セレン酸の信号強度が SeMet の信号強度と同程度であることから, 塩酸を加えることにより SELM-1 中の SeMet が分解されていることが確認できた. 酵素分解法により前処理を行った SELM-1 中の SeMet を, species-unspecific IDA で定量したクロマトグラムを Fig. 3 b に示す. 保持時間 8.1 分に観測されているピークが SeMet である. 酵素分解法では, 保持時間 4.2 分の亜セレン酸のピークが塩酸分解法に比べて小さくなっており, SeMet の分解が塩酸分解法の時と比べて少なくなっ

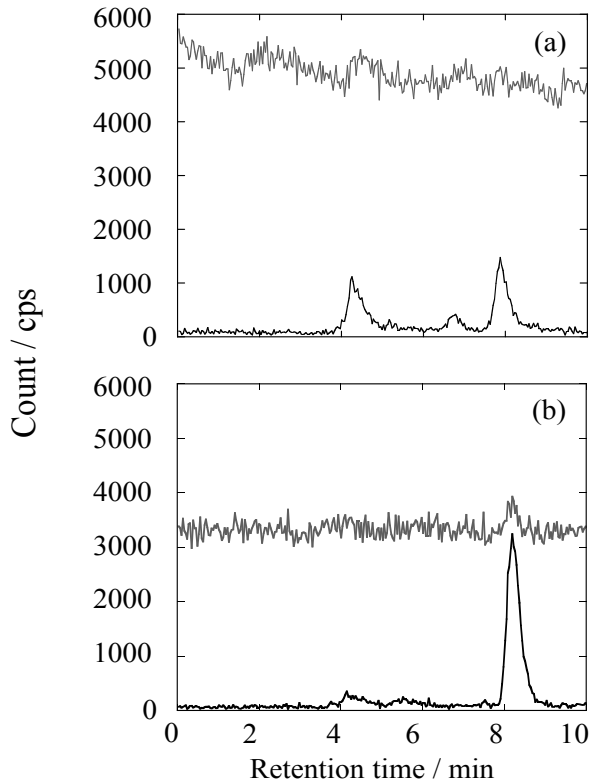


Fig. 3 HPLC-ICP3DQMS chromatograms of Se in the SELM-1 extract

(a) hydrochloric acid digestion; (b) enzymatic digestion. — ^{80}Se , — ^{82}Se .

いと判断できる。二つの分解方法の SeMet 回収率は塩酸分解法が $19 \pm 3\%$ ($n = 3$) であり、酵素分解法が $88 \pm 4\%$ ($n = 3$) であった。回収率が酵素分解法のほうが高いため、SELM-1 中の SeMet の前処理には酵素分解法が適しているといえる。そのため species-specific IDA の試料の前処理は酵素分解法を用いることとした。

3・4 2種類の IDA の比較

酵素分解法により抽出した SELM-1 中の SeMet を species-unspecific IDA 及び species-specific IDA で測定した際のクロマトグラムを Fig. 4 a, b に、定量結果を Table 2 に示す。species-specific IDA の測定値が $3154 \pm 82 \mu\text{g g}^{-1}$ (%RSD: 2.6%, 回収率 $91 \pm 5\%$, $n = 3$) で、species-unspecific IDA では $3040 \pm 77 \mu\text{g g}^{-1}$ (%RSD: 2.5%, 回収率 $88 \pm 4\%$, $n = 3$) であった。それぞれの測定値は、species-specific IDA が 2σ で、species-unspecific IDA が 4σ で保証値と一致した。また、NRC らの測定結果と比較すると²³⁾, methanesulfonic acid や *p*-toluol-sulfonic acid + 0.2% triptamine を使用した試料の抽出では、回収率が悪いものが見受けられる (Table 2)。species-specific IDA は、前処理時に起こる試料の損失も考慮できるため、測定対象物質が前処理の段階で分解が生じる場合に有効である。Fig. 4 b

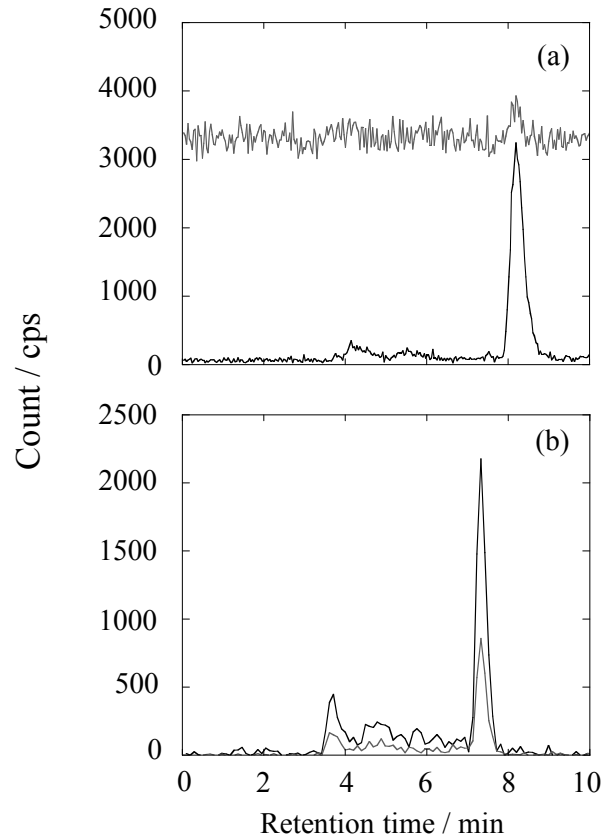


Fig. 4 HPLC-ICP3DQMS chromatograms of Se in the SELM-1 extract

(a) species-unspecific IDA; (b) species-specific IDA. — ^{80}Se , — ^{82}Se .

の species-specific IDA のクロマトグラムをみると、亜セレン酸のピークの $^{80}\text{Se}/^{82}\text{Se}$ の比が 1.3 ± 0.2 と天然同位体比 (5.68) と異なるため、外因性の ^{82}Se が存在していると考えられる。そこで、亜セレン酸のピーク中の $^{82}\text{SeMet}$ が分解されて生じた分の ^{82}Se のカウントを、SeMet のピーク中の $^{82}\text{SeMet}$ 由来の ^{82}Se のカウント及び亜セレン酸のピーク中の $^{82}\text{SeMet}$ が分解されて生じた分の ^{82}Se のカウントの和で割ることにより、酵素分解時における SeMet の分解率を算出したところ、 $8.3 \pm 1.0\%$ ($n = 3$) の SeMet が分解されていた。species-unspecific IDA による SeMet の回収率に、SeMet が分解して分析できなかった量を考慮すると、 $96 \pm 4\%$ の SeMet を説明できる。この結果は、species-unspecific IDA の測定値が保証値と大きくずれている要因が、カラム内での SeMet の吸着に加えて、酵素分解時に SeMet が $8.3 \pm 1.0\%$ 分解されるためであることを示唆している。一方、species-specific IDA は酵素分解時にスパイクを添加しているために、酵素分解時の損失及びカラム内での吸着も補正できるため、確度の高い定量が可能であったと考えられる。したがって、安定同位体を濃縮した化合物を合成できる場合には、species-specific IDA が理想的な手法である。さらに、

Table 2 Analytical results of the SeMet concentrations in SELM-1, and a comparison of the analytical results among 8 laboratories, 10 digestion methods, and 9 detection methods

Laboratory ^{a)}	Digestion method	Determination method	SeMet concentration ^{b)/} µg g ⁻¹	Recovery ^{c)/} %
Chuo	Protease + Lipase, 24 h	Species specific IDA	3154 ± 82 (2.6 %) n = 3	91 ± 5
	Protease + Lipase, 24 h	Species unspecific IDA	3040 ± 77 (2.5 %) n = 3	88 ± 4
BCU	Protease XIV, 24 h	EC	2576 ± 139 (5.4 %)	75 ± 5
	3 M <i>p</i> -toluol-sulfonic acid + 0.2 % triptamine	EC	2073 ± 50 (2.4 %)	60 ± 3
LGC	Protease + Lipase, 20 h	SA and EC	2991 ± 115 (3.8 %)	87 ± 5
PAU	Protease + Lipase, 17 h	SA and IS (Rh)	3437 ± 65 (1.9 %)	100 ± 5
NRC	Methanesulfonic acid, 16 h, reflux, Met-chloformate derivatisation	ID (¹³ C, ⁷⁴ Se)	3461 ± 27 (0.8 %)	100 ± 4
	Methanesulfonic acid, 16 h, reflux, Met-chloformate derivatisation	ID (¹³ C, ⁷⁴ Se)	3407 ± 14 (0.4 %)	99 ± 4
	Methanesulfonic acid, 16 h, reflux, methanesulfonic acid, 16 h, reflux, no derivatisation	ID (¹³ C, ⁷⁴ Se)	3481 ± 73 (2.1 %)	101 ± 5
USDA	Methanesulfonic acid, 16 h, reflux, CNBr derivatisation	ID (⁷⁴ Se)	3279 ± 18 (0.5 %)	95 ± 4
UC	Methanesulfonic acid, 16 h, reflux	SA and IS	1970 ± 59 (3.0 %)	57 ± 3
OVIE	Protease + Lipase, 16 h	Post column IDA (⁷⁷ Se)	3587 ± 48 (1.3 %)	104 ± 5

a) Abbreviations of each laboratory are itemized as following. Chuo: Chuo University (this study); BCU: Budapest Corvinus University, Dept. of Applied Chemistry; LGC: Laboratory of Government Chemist; PAU: Group of Bio-Inorganic Analytical Chemistry, CNRS UMR5034; NRC: Institute for National Measurement Standards, National Research Council of Canada; USDA: United States Department of Agriculture, Beltsville Human Nutrition Research Center, Food Composition Laboratory; UC: University of Cincinnati, Department of Chemistry; OVIE: University of Oviedo, Department of Physical and Analytical Chemistry; These reported values were referenced from Ref. 23. b) The value in brackets indicates % RSD. c) Recoveries are calculated with using certified value (3448 ± 146 µg g⁻¹).

測定対象物質が前処理の段階で分解が起きる場合や分析中に損失が起る場合には, species-unspecific IDA では不十分であり, species-specific IDA を用いる必要がある。

4 結 論

SELM-1 中の SeMet の前処理は塩酸分解法を用いると, 塩酸によって SeMet が分解されて回収率が低くなるため, SELM-1 中の SeMet の前処理方法としては適していない。一方, Lipase VII と Protease Type XIV を用いた酵素分解法は回収率が 88 ± 4 % と高い値であるため, SELM-1 中の SeMet の前処理方法として適していることが明らかになった。また, 2 種類の IDA の結果は, species-specific IDA が 3154 ± 82 µg g⁻¹ で, species-unspecific IDA が 3040 ± 77 µg g⁻¹ であった。また, 保証値とそれぞれ 2σ, 4σ で一致した。SeMet の回収率は species-specific IDA の方が高いことから, 試料の前処理時とカラム内での損失を補正できる species-specific IDA の方が確度の高い手法であるといえる。したがって, 安定同位体を濃縮した化合物を合成できる場合には species-specific IDA が有効な手法であるといえ

る。また, species-unspecific IDA 測定において保証値との差が大きくなった要因としては, カラム内での SeMet の吸着や, 酵素分解時に SeMet が 8.3 ± 1.0 % 分解されていることが大きく影響していると考えられる。

文 献

- 1) E. Dumont, F. Vanhaecke, R. Cornelis : *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**, 1304 (2006).
- 2) 厚生労働省 : 日本人の食事摂取基準 (2005).
- 3) 小宮和英, 大高順子, 河内 佐, 桜井 弘 : 衛生化学, **24**, 163 (1978).
- 4) D. G. Sar, M. Montes-Bayon, E. B. Gonzalez, L. M. S. Zapico, A. Sanz-Medel : *Chem. Res. Toxicol.*, **24**, 896 (2011).
- 5) 西村康宏, 大畑昌輝, 古田直紀, 鍋島貴之 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **53**, 527 (2004).
- 6) 堀込 純, 古田直紀 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **54**, 373 (2005).
- 7) 横山恵信, 佐藤啓市, 古田直紀 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **55**, 587 (2006).
- 8) C. Vandecasteele, C. B. Block : "Modern Methods for Trace Element Determination", p. 242 (1997), (J. Wiley & Sons, New York).

- 9) K. Inagaki, A. Takatsu, A. Nakama, S. Eyama, T. Yarita, K. Okamoto, K. Chiba : *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**, 67 (2006).
- 10) C. S. Muniz, J. M. M. Gayon, J. I. García-Alonso, A. Sanz-Medel : *J. Anal. At. Spectrom.*, **16**, 587 (2001).
- 11) V. D. Huerta, L. H. Reyes, J. M. M. Gayon, M. L. F. Sánchez, A. Sanz-Medel : *J. Anal. At. Spectrom.*, **18**, 1243 (2003).
- 12) K. G. Heumann, L. Rottmann, J. Vogl : *J. Anal. At. Spectrom.*, **9**, 1351 (1994).
- 13) K. G. Heumann : *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 318 (2004).
- 14) H. Goenaga-Infante : *Anal. Bioanal. Chem.*, **390**, 629 (2008).
- 15) H. G. Iglesias, M. L. F. Sánchez, J. A. Rodríguez-Castrillon, J. I. García-Alonso, J. L. Sastre, A. Sanz-Medel : *J. Anal. At. Spectrom.*, **24**, 460 (2009).
- 16) H. G. Iglesias, M. L. F. Sánchez, J. I. García-Alonso, A. Sanz-Medel : *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 707 (2007).
- 17) P. Jitaru, M. Roman, G. Cozzi, P. Fisicaro, P. Cescon, C. Barbante : *Microchim. Acta.*, **166**, 319 (2009).
- 18) K. Lunøe, J. G. Martínez-Sierra, B. Gammelgaard, J. I. García-Alonso : *Anal. Bioanal. Chem.*, **402**, 2749 (2012).
- 19) T. Delatour, F. Fenaille, V. Parisod, J. Richoz, J. Vuichoud, P. Mottier, T. Buetler : *J. Chromatogr. B*, **851**, 268 (2007).
- 20) L. H. Reyes, F. M. Sanz, P. H. Espilez, J. M. Marchante-Gayon, J. I. García-Alonso, A. Sanz-Medel : *J. Anal. At. Spectrom.*, **19**, 1230 (2004).
- 21) J. Zheng, M. Ohata, N. Furuta, W. Kosmus : *J. Chromatogr. A*, **874**, 55 (2000).
- 22) T. Matsukawa, H. Hasegawa, Y. Shinohara, J. Kobayashi, A. Shinohara, M. Chiba, K. Ichida, K. Yokoyama : *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 1658 (2010).
- 23) Z. Mester, S. Willie, L. Yang, R. Sturgeon, J. A. Caruso, M. L. Fernández, P. Fodor, R. J. Goldschmidt, H. Goenaga-Infante, R. Lobinski, P. Maxwell, S. McSheehy, A. Polatajko, B. B. M. Sadi, A. Sanz-Medel, C. Scriver, J. Szpunar, R. Wahlen, W. Wolf : *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**, 168 (2009).

**Determination of Selenomethionine in Selenium Enriched Yeast by
Using Species-unspecific and Species-specific Isotope
Dilution Analysis with HPLC-ICPMS**

Takao YAMAMOTO¹, Tatsuya MUKAI¹, Yoshinari SUZUKI¹, Takehisa MATSUKAWA²,
Atsuko SHINOHARA² and Naoki FURUTA^{®1}

[®] E-mail : nfuruta@chem.chuo-u.ac.jp

¹ Faculty of Science and Engineering, Department of Applied Chemistry, Chuo University, 1-13-27, Kasuga, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8551

² Faculty of Medicine, Juntendo University, 2-1-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421

(Received January 24, 2013; Accepted April 22, 2013)

Determination of selenomethionine (SeMet) in a selenium-enriched yeast standard material (SELM-1, National Research Council of Canada, NRC) was carried out, and extraction methods were investigated. SeMet in SELM-1 was determined by using a hyphenated instrument of HPLC, and an inductively coupled plasma-three dimensional quadrupole mass spectrometer (HPLC-ICP3DQMS), and two different isotope dilution analysis methods (species-unspecific IDA and species-specific IDA). Two different IDA methods were evaluated by comparing the analytical results. It was confirmed that enzymatic hydrolysis with using Lipase VII (Sigma Chemicals, St, Luis, MO, USA) and Protease, Type XIV (Sigma Chemicals, St, Luis, MO, USA) for 24 hours was appropriate for the extraction of SeMet. Our analytical values of SeMet for species-unspecific IDA ($3040 \pm 77 \mu\text{g g}^{-1}$) and species-specific IDA ($3154 \pm 82 \mu\text{g g}^{-1}$) showed agreements with the certified value ($3448 \pm 146 \mu\text{g g}^{-1}$) within 4σ and 2σ , respectively. It is concluded that species-specific IDA should be used when a stable isotope enriched compound could be synthesized.

Keywords: selenium enriched yeast; selenomethionine (SeMet); HPLC-ICP3DQMS; isotope dilution analysis (IDA); species-specific IDA.