

有機水銀，無機ヒ素の化学形態別分析方法の検討

Examination of speciation analysis method for organic mercury or inorganic arsenic

高橋祐介 瀧澤 裕 大倉 靖

Yusuke Takahashi, Yu Takizawa, Yasushi Okura

食品に含まれる有機水銀（モノメチル水銀）及び無機ヒ素の化学形態別分析方法について検討し、いずれの元素においても誘導体化により良好な感度と精度をもって測定可能であることを確認した。モノメチル水銀については、テトラフェニルホウ酸ナトリウム溶液を用いたフェニル化により、測定溶液として定量下限値 7.5ng/ml, 300ng/ml までの直線性を確認した。無機ヒ素については、五価ヒ素の三価ヒ素への還元のもの、ジメルカプト-1-プロパノールとの複合体化により、測定溶液として定量下限値 0.1ng/ml, 200ng/ml までの直線性を確認した。いずれの測定においても測定溶液に含まれる同一元素の他の化学形態の影響は確認されず、定量下限値における 6 回繰り返し測定において併行精度 (RSD%) が 10%未満であり、良好な精度をもった測定方法であることを確認した。

キーワード：メチル水銀；無機ヒ素；ガスクロマトグラフ-質量分析装置；誘導体化

Key words: Methyl Mercury; Inorganic Arsenic; GC-MS; Derivatization

1 はじめに

有害重金属の摂取について、国際的な基準作りが進みつつある。現在、国内では、コメ中のカドミウム (Cd)、水産物中の水銀 (Hg) について基準値又は暫定的規制値が設定されている^{1),2)}。国内における有害重金属の中毒事例として、カドミウム、水銀の他に、銅 (Cu)、亜鉛 (Zn)、ヒ素 (As)、スズ (Sn)、クロム (Cr)、鉛 (Pb) によるものが報告されている³⁾。食品中金属元素分析方法として、総水銀及び総ヒ素の分析方法については、既報⁴⁾により報告したところである。

しかしながら、元素によっては化学形態により毒性が異なるものがある。水環境中における水銀は、微生物等により毒性の強いメチル水銀に代謝され、食物連鎖を通して大型魚類に蓄積されることが知られている。このため、総水銀の暫定的規制値を超える水銀を検出した魚類については、メチル水銀の個別分析を実施しなければならない。現在、当センターの検査実施標準作業書では、ベンゼン抽出の後にガスクロマトグラフ-電子捕獲検出器 (GC-ECD) による測定を行っているが、ベンゼン使用による環境負荷と電子捕獲検出器を保有するための放射能安全管理という問題がある。

ヒ素については、アルセノベタインや糖化合物 (アルセノシュガー) 等の有機態は比較的毒性が低いとされているが、無機形態であるヒ酸及び亜ヒ酸の毒性が高く、無機ヒ素を多く含む海藻類の摂取を控えるよう勧告している国もある。現在は、食品中のヒ素含有量に関する基準値等はないが、化学形態別分析を実施することでヒ素の摂取実態を把握することができる。食品に含まれるヒ素の化学形態別分析が可能な機器として、高速液体クロマトグラフ-誘導結合プラズマ-質量分析装置 (HPLC-ICP-MS) が挙げられるが、当センターには整

備されていない。

本研究では、食品中の有害重金属類のうち、水銀とヒ素の化学形態別分析を実施するために、誘導体化によりガスクロマトグラフ-質量分析装置 (GC-MS) といった汎用機器での分析が可能となるか検討し、「食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」⁵⁾ (以下、「金属ガイドライン」という。) に従い、選択性、検量線の直線性、定量下限値、定量下限値における併行精度を評価した。

2 対象及び検査方法

2.1 試薬類

有機水銀の標準品として塩化メチル水銀、塩化エチル水銀、酢酸フェニル水銀 (いずれも関東化学) を用いた。無機ヒ素の標準品としてヒ素標準溶液 (関東化学)、有機ヒ素の標準品としてアルセノベタイン (NMIJ CRM 7901-a No.152)、ジメチルアルシン酸 (NMIJ CRM 7913-a No.115)、メチルアルソン酸、フェニルアルソン酸 (いずれも関東化学) を用いた。誘導体化反応試薬として、塩酸、テトラフェニルホウ酸ナトリウム、ヘキサン、L-システイン、10%塩化スズ溶液、0.1mol/l ヨウ化カリウム溶液、ジメルカプト-1-プロパノール、トルエン (いずれも関東化学) を使用した。

2.2 方法

2.2.1 メチル水銀のフェニル化

有機水銀標準品の希釈は全て 1%システイン溶液水を用いて行った。有機水銀標準溶液を水銀としてそれぞれ 1ppm となるよう希釈、混合し、その 10ml を GC-MS の選択的イオン分析 (SIM) 条件の検討に用いた。GC-MS の SIM 条件を確定した後に定量範囲と定量下限値の確認のため、7.5, 15, 30, 45, 90, 150, 300ng/ml の標

準溶液をそれぞれ 10ml 調製した。

有機水銀のフェニル誘導体化法については、西村らの方法⁶⁾を参考とし、塩酸酸性条件下においてテトラフェニルホウ酸ナトリウムによるフェニル化を行い、フェニル化アルキル水銀をヘキサンに抽出する方法を採用した。調製した各標準溶液 10ml に対し、6N HCl を 0.2ml、1%テトラフェニルホウ酸ナトリウム溶液を 2.5ml、*n*-ヘキサンを正確に 5ml 添加し、室温で 120 分間緩やかに振とうした。振とう後に 2500rpm、5 分間遠心分離し、ヘキサン層を回収した。回収したヘキサン層に無水硫酸ナトリウムを少量加え、水分の混入がないことを確認し、GC-MS を用いて測定した。

2.2.2 ヒ素化合物のジメルカプト-1-プロパノール複合体化

無機ヒ素の還元については、竹内らの方法⁷⁾を参考とし、溶液中の無機ヒ素 (As(III), As(V)) を還元剤により As(III) とし、ジメルカプト-1-プロパノール (BAL) 複合体化を行うこととした。ヒ素の還元は、10%塩化スズ溶液、0.1mol/l ヨウ化カリウム溶液を使用した。BAL は 0.2%メタノール溶液として使用した。

ヒ素標準溶液は精製水を用いて 1ppm に希釈し、その 10ml を GC-MS の SIM 条件の検討に用いた。GC-MS の SIM 条件を確定した後に定量範囲と定量下限値の確認のため、0.1, 1, 10, 50, 100, 200ng/ml の無機ヒ素標準溶液をそれぞれ 10ml 調製した。ヒ素標準溶液 10ml に 10%塩化スズ溶液 1ml、0.1mol/l ヨウ化カリウム溶液 1ml 及び 0.2%BAL 溶液 1ml を加え、トルエンを正確に 5ml 添加し、室温で 30 分間緩やかに振とうした。振とう後に 2500rpm、5 分間遠心分離し、トルエン層を回収した。回収したトルエン層に無水硫酸ナトリウムを少量加え、水分の混入がないことを確認し、GC-MS を用いて測定した。

2.3 ガスクロマトグラフ-質量分析装置条件

誘導体化後の水銀及びヒ素の検出には、Varian 社製 CP3800GC-1200L 質量分析装置を使用した。分析においては、Scan モードによりフェニル化アルキル水銀及びヒ素-BAL 複合体のマススペクトルを確認した。定量は SIM モードにて実施した。GC-MS による分析条件を表 1 に示す。

表 1 機器分析条件

	メチル水銀分析	無機ヒ素分析
装置	Varian3800GC-1200LTQMS	
カラム	Agilent HP-5MS	
注入口温度	280℃	
キャリアガス	ヘリウム	
オープン温度	0min 50℃, 1min → 15℃min ⁻¹ → 280℃, 5min	
イオン源	280℃	
測定イオン(m/z)	292,294	212,214

3 結果

3.1 フェニル化アルキル水銀の Scan 測定

フェニル化アルキル水銀について GC-MS 測定を実施した結果、図 1 に示すクロマトグラムが得られた。フェニル化メチル水銀 (Me-Phe-Hg)、フェニル化エチル水銀 (Et-Phe-Hg) 及びジフェニル水銀 (Phe-Phe-Hg) は、それぞれ独立したピークとして検出され (図 1 ピーク 1A, 2A, 3A)、本方法によりモノアルキル水銀の分離分析が可能であることを確認した。

各フェニル化アルキル水銀のピークについてマススペクトル (図 2) を確認したところ、マススペクトルの m/z 値及びその存在比は、水銀の安定同位体 (図 2A) にアルキル基及びフェニル基が付加したもの (図 2B,C,D) と一致したため、当該ピークはフェニル誘導体化されたモノアルキル水銀であることが確認された。

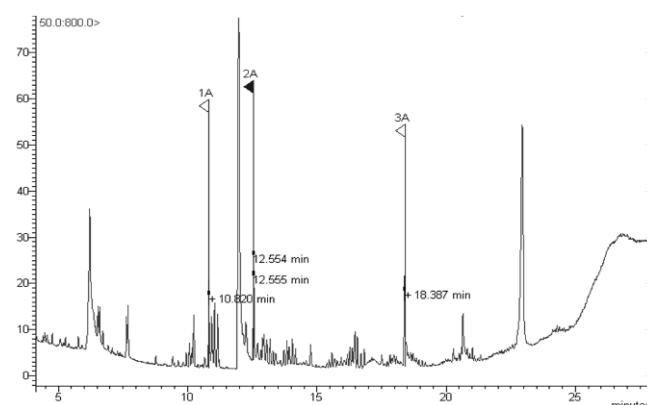


図 1 フェニル化モノアルキル水銀のクロマトグラム

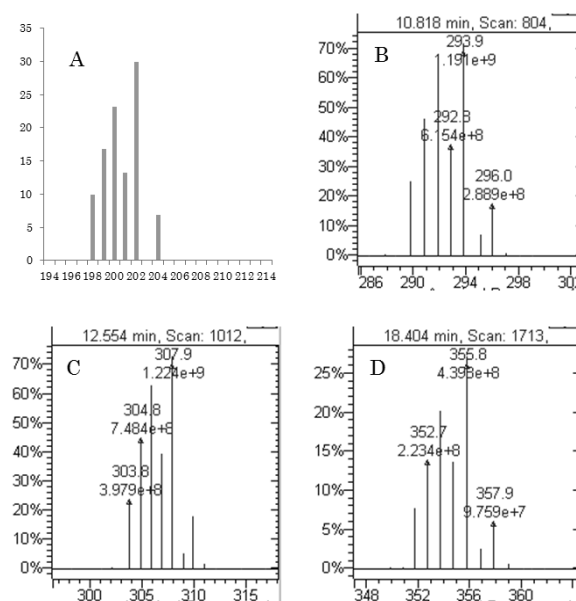


図 2 各ピークのマススペクトル

A 水銀の同位体存在比, B フェニル化メチル水銀のマススペクトル, C フェニル化エチル水銀のマススペクトル, D ジフェニル水銀のマススペクトル

表 2 有機水銀の定量下限値繰り返し試験結果(n=6)

化合物	定量下限 (ng/ml)	平均値 (ng/ml)	標準偏差	CV (%)
Me-Hg	7.5	9.0	0.25	2.8
Et-Hg	7.5	10	0.77	7.6
Phe-Hg	7.5	8.4	0.14	1.7

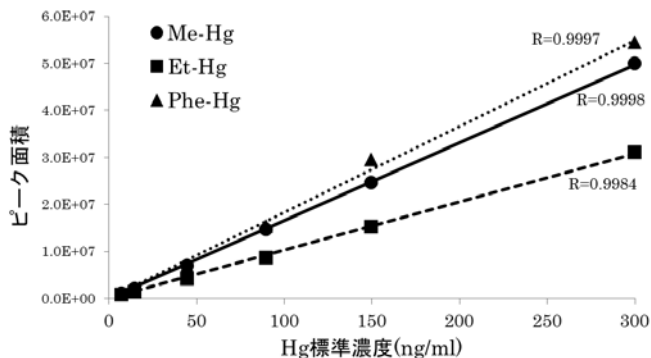


図 3 有機水銀の定量範囲

3.2 フェニル化アルキル水銀の定量範囲の確認

フェニル化アルキル水銀の定量範囲の確認は、3.1により得られたマススペクトルから表1のとおり定量イオン、確認イオンを設定し、SIMモードにて実施した。メチル水銀の測定においてシグナル/ノイズ比が10以上を示した濃度(7.5ng/ml)を定量下限値とし、6回繰り返し測定を行ったところ、併行精度(相対標準偏差)は、10%未満であり定量下限値付近での良好な測定精度が確認された(表2)。また、定量範囲は、7.5ng/mlから300ng/mlまでの範囲で検量線の相関係数 $R > 0.999$ となることを確認し、本測定方法において広い濃度範囲で定量が可能であることを確認した(図3)。

3.3 ヒ素-BAL 複合体の Scan 測定

ヒ素-BAL 複合体についてGC-MS測定を実施した結果、図4に示すクロマトグラム及び図5に示すマススペクトルが得られた。ヒ素-BAL 複合体は、単一のピークとして検出され、本方法により無機ヒ素の分離分析が可能であることを確認した。検出されたピークのマススペクトルを確認したところ、マススペクトルの m/z 値及びその存在比は、無機ヒ素にBAL及びメチル基が付加した物と推定された。自然界に存在するヒ素は ^{75}As のみであるが、当該ピークからはBALに含まれる硫黄原子の同位体存在比に由来すると思われる2種類のイオンが検出されており、当該ピークはヒ素-BAL 複合体であることが確認された。有機ヒ素標準品としてアルセノベタイン、メチルアルソン酸、ジメチルアルシン酸、フェニルアルソン酸について同様の分析を実施したところ、有機ヒ素標準品を用いた試験液及び無機-有機ヒ素混合標準溶液からは有機ヒ素-BAL 複合体のピークは確認できず(図6)、本方法は無機ヒ素のみを選択的に検出できる分析方法であることを確認した。

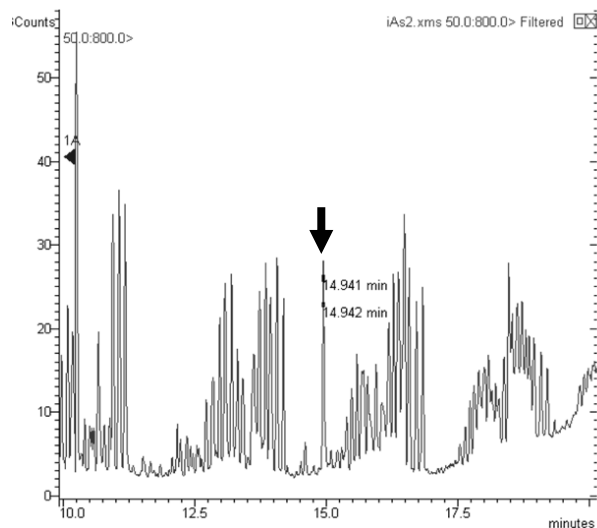


図 4 BAL 複合体化無機ヒ素のクロマトグラム

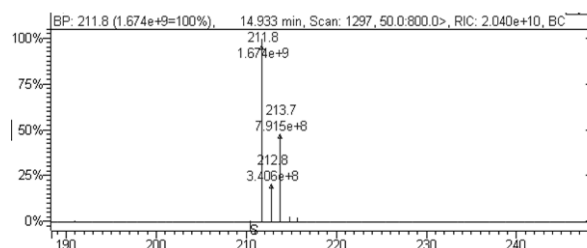


図 5 BAL 複合体化無機ヒ素のマススペクトル

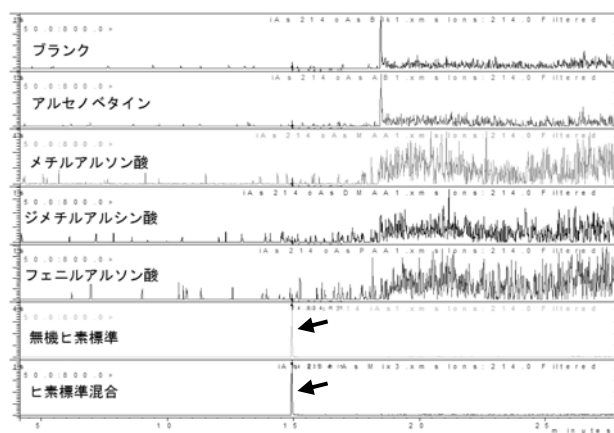


図 6 有機態ヒ素標準品のクロマトグラム

3.4 ヒ素-BAL 複合体の定量範囲の確認

ヒ素-BAL 複合体の定量範囲の確認は、3.3により得られたマススペクトルから表1のとおり定量イオン、確認イオンを設定し、SIMモードにて実施した。ヒ素-BAL 複合体の測定においてシグナル/ノイズ比が10以上を示した濃度(0.1ng/ml)を定量下限値とし、6回繰り返し測定を行ったところ、併行精度(相対標準偏差)は、10%未満であり定量下限値付近での良好な測定精度が確認された(表3)。また、定量範囲は、0.1ng/mlから200ng/mlまでの範囲で検量線の相関係数 $R > 0.999$ となることを確認し、本測定方法において広い濃度範囲で定量が可能であることを確認した(図7)。

表3 無機ヒ素の定量下限値繰り返し試験結果(n=6)

化合物	定量下限 (ng/ml)	平均値 (ng/ml)	標準偏差	CV(%)
無機ヒ素	0.1	0.081	0.007	8.5

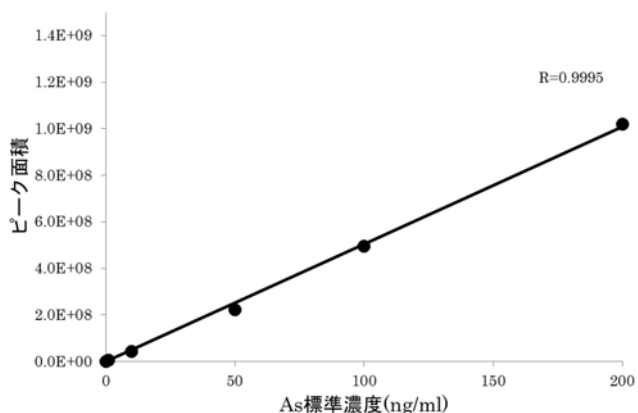


図7 無機ヒ素の定量範囲

4 考察

本研究では、有害金属元素のうち、存在する化学形態により毒性が異なる元素として、水銀とヒ素について毒性の強い化学形態（有機水銀、無機ヒ素）を個別に分析する方法について検討した。

有機水銀については、西村らによるフェニル誘導体化法を参考としたが、良好な結果が得られた。本研究では、メチル水銀の定量下限値が 7.5ng/ml であるが、現在当センターで検討している有機水銀抽出方法においては、メチル水銀の暫定的規制値 (0.3mg/kg) における抽出液の濃度を 60ng/ml と想定しており、暫定的規制値に対し

て十分な感度を有するものと評価している。今後、本方法をメチル水銀の分析方法として採用するには、抽出方法を含む分析方法について金属ガイドラインに基づいた妥当性評価の実施が必要である。

無機ヒ素について食品中の基準値は存在しないが、本研究において検討した方法では、HPLC-ICP-MS によらず、GC-MS のみで無機ヒ素の分析が可能になった。本方法により食品由来の無機ヒ素摂取量調査がより簡便に実施できるようになり、県民の健康リスク評価及び健康被害の予防への展開が可能となると考えられる。

参考文献

- 1) 食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について、食安発0408第2号，平成22年4月8日
- 2) 魚介類の水銀の暫定的規制値について，環乳第99号，昭和48年7月23日
- 3) HACCP 関連情報データベース，
http://www.shokusan.or.jp/haccp/hazardous/2_8_ziyukin.html
- 4) 超臨界処理装置を用いた食品中有害金属分析法の検討，宮城県保健環境センター年報No.31，2013
- 5) 食品中の金属試験法に関する妥当性評価ガイドラインについて，食安発第0926003号，平成20年9月26日
- 6) 抽出溶媒にベンゼン及びトルエンを用いない魚介類中のアルキル水銀分析法の検討，分析化学 Vol.61，No.10，2012
- 7) GC-MS による尿中ヒ素化合物の分析法の開発，第18回ヒ素シンポジウム講演要旨集，2012