

海産物中の有機ヒ素分析法開発

戸渡寛法・宮崎悦子・中牟田啓子・赤木浩一*・片岡洋平**・渡邊敬浩**

福岡市保健環境研究所保健科学課

*福岡市水道局浄水部水道水質センター

**国立医薬品食品衛生研究所

Development of Analytical Method for Organic Arsenic in Seafood

Hironori TOWATARI, Etsuko MIYAZAKI, Keiko NAKAMUTA, Kouichi AKAKI,
Yohei KATAOKA and Takahiro WATANABE

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

Water Quality Center, Water Purification Section, Fukuoka City Waterworks Bureau

National Institute of Health Sciences

要約

ヒ素化合物摂取による健康リスクを評価するための基礎データの取得に不可欠な分析法として、LC-MS/MSを用いた食品中の有機ヒ素化合物6種（モノメチルアルソン酸、ジメチルアルシン酸、トリメチルアルシンオキサイド、テトラメチルアルソニウム、アルセノベタイン、アルセノコリン）の一斉分析法を開発した。この分析法の性能を評価するために、認証試料及び添加試料を分析した。また、ICP-MSを用いた総ヒ素分析を併行して行い、結果を比較した。認証試料の分析結果と付与されていた認証値との比較から、開発した分析法のアルセノベタインを対象とした真度は78%、総ヒ素分析法の真度は102%と推定された。添加試料の分析結果から、回収率はテトラメチルアルソニウムで13%と低かったものの、その他5種の有機ヒ素化合物では47~116%、総ヒ素では109%であった。性能評価した分析法を用いて、福岡市内に流通していた魚介類8試料を分析した結果、すべての試料からアルセノベタインが0.86~5.2 mg/kgの濃度（ヒ素として）で検出され、試料の総ヒ素濃度の5割程度を占めることが明らかになった。

Key Words : 有機ヒ素化合物 organic arsenic compounds, 海産物 seafood, 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析装置 LC-MS/MS, 誘導結合プラズマ質量分析装置 ICP-MS

1 はじめに

ヒ素は、無機態に加え、モノメチルアルソン酸(MMA)、ジメチルアルシン酸(DMA)、トリメチルアルシンオキサイド(TMAO)、テトラメチルアルソニウム(TeMA)、アルセノベタイン(AB)、アルセノコリン(AC)などの有機態の化合物として環境中に広く存在しており、異なる毒性を持つことが知られている。また、植物性の食品や海産物などにもヒ素化合物は含まれるが、形態は食品の種類に応じて異なっている。さらに近年、ヒ素化合物の長期摂取による健康リスクが懸念されている。精密なリスク評価のためには形態別の摂取量推定が不可欠であり、その推定の基礎となるデータを得るためのヒ素形

態別分析法の開発が求められている。ヒ素形態別分析法としては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)を用いた方法が報告されているが、この方法では液体クロマトグラフィーによるヒ素化合物の完全な分離が必要であり、イオンペア試薬による機器の汚染などの課題がある。

そこで本研究では、完全分離の必要がなく、食品中の残留農薬等の分析で広く使用されている高速液体クロマトグラフタンデム質量分析装置(LC-MS/MS)による有機ヒ素形態別分析法を開発した。また、魚肉を基材とする認証試料や添加試料の分析を通じて性能を評価した後、福岡市内を流通していた海産物を分析した。以上の結果を、分析結果の適正を判断するために併行して実施

した誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) による総ヒ素分析の結果と合わせて報告する。

2 実験方法

2.1 試料

分析法の性能評価には、認証試料として認証標準物質 NMIJ CRM 7402-a タラ魚肉粉末(総ヒ素認証値 36.7 ± 1.8 mg/kg, AB 認証値 (ヒ素として) 35.5 ± 1.8 mg/kg) を使用した。

流通していた海産物として魚介類 8 試料 (サワラ, ハマチ, マアジ, メバル, マダイ, ウマヅラハギ, イサキ, スルメイカ) の筋肉部と, 海藻エゴノリを原料とする福岡市の特産品「おきうと」7 試料を入手し, 均質化して試料とした。

2.2 試薬及び試液

超純水: ADVANTEC 東洋(株)製 ULTRAPURE WATER SYSTEM により製造 (比抵抗 >18.2 M Ω ·cm, TOC <1 ppb)

硝酸: 関東化学(株)製 硝酸 1.42 (超高純度試薬)

酢酸: 関東化学(株)製 特級

0.15 mol/L 硝酸: 硝酸 4.8 mL を水で希釈して 500 mL としたもの。

3%酢酸添加 1%硝酸: 酢酸 30 mL 及び硝酸 10 mL を超純水で希釈して 1,000 mL としたもの。

1%硝酸: 硝酸 10 mL を超純水で希釈して 1,000 mL としたもの。

標準品: MMA, DMA, AB, AC は和光純薬工業(株)製を, TMAO, TeMA は(株)トリケミカル研究所製を, ヒ素標準液 (1,000 mg/L), ガリウム標準液 (1,000 mg/L) は関東化学(株)製を使用した。

2.3 標準溶液の調製

有機ヒ素形態別分析法の検量線用標準溶液は, 各標準品を超純水で溶解, 希釈し, MMA を $0.01 \sim 0.5$ μ g/mL, その他 5 種の有機ヒ素化合物を $0.001 \sim 0.5$ μ g/mL の範囲で調製した。

総ヒ素分析法の検量線用標準溶液は, ヒ素標準溶液を 3%酢酸添加 1%硝酸により希釈し, $0.05 \sim 5$ ng/mL の範囲で調製した。内部標準液は, ガリウム標準液を 1%硝酸で希釈し 100 ng/mL とした。

2.4 有機ヒ素形態別分析用試験溶液の調製

試料 2.0 g (乾燥品は 0.2 g) を採取し, 0.15 mol/L 硝酸を 5 mL 加え, 100°C で 2 時間加熱し, 30 分おきに攪拌した。遠心分離 ($2600 \times g$, 10 分間) 後, 水層を分取した。

残渣に超純水 5 mL を加えて振とう後, 同様に遠心分離し水層を合わせる操作を 2 回繰り返す, 合わせた水層を 20 mL に定容後, 10 倍希釈した。孔径 0.20 μ m のメンブランフィルターでろ過したものを測定溶液とした。

2.5 総ヒ素分析用試験溶液の調製

試料 0.20 g を採取して硝酸 5 mL を加え, マイクロ波分解装置 (MW) による分解後, 超純水で 50 mL に定容した。そのうち 1 mL を採取して酢酸 0.3 mL を加え, 超純水で 10 mL としたものを測定溶液とした。

なお, MW には PerkinElmer 社製マルチウェーブを使用し, 500 W で 5 分間, 1,000 W で 30 分間, 500 W で 15 分間を分解条件とした。

2.6 分析装置及び測定条件

有機ヒ素形態別分析のための LC-MS/MS 測定条件として, 使用機器及び HPLC 条件を表 1 に, イオン源パラメータを表 2 に, 化合物ごとのイオン化条件を表 3 に示す。また, 総ヒ素分析のための ICP-MS 測定条件を表 4 に示す。

表 1 有機ヒ素形態別分析の使用機器及び HPLC 条件

HPLC	Agilent Technology 1200 Series
MS/MS	ABSciex 4000QTrap
HPLCカラム	資生堂CR1:50 (2 mm \times 150 mm)
移動相A	0.1 %ギ酸
移動相B	0.1 %ギ酸アセトニトリル
流速	0.2 mL/min
グラジエント	B 99 % (0~1.5 min) →B 1 % (1.5~10min)
注入量	1 μ L

表 2 有機ヒ素形態別分析イオン源パラメータ

イオン化 モード	CUR (psi)	CAD (-)	IS (V)	TEM ($^\circ\text{C}$)	GS1 (psi)	GS2 (psi)
ESI (+)	10	8	5500	700	40	70

表 3 有機ヒ素形態別分析のイオン化条件

分析対象 化合物	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)
MMA	141.1	90.9	46	31
DMA	139.1	90.8	46	27
TMAO	137.1	121.9	66	25
TeMA	135.1	119.8	61	25
AB	179.2	120.0	66	29
AC	165.2	120.8	66	25

3 結果及び考察

3.1 定量下限値の推定

0.001 µg/mL 又は 0.01 µg/mL の標準溶液を 10 回繰り返し測定し、ピーク面積の標準偏差の 10 倍を試料濃度換算することにより推定した有機ヒ素形態別分析法の定量下限値は、0.04~1 mg/kg であった。また、空試験溶液を 10 回繰り返し測定し、ノイズ強度の標準偏差の 10 倍を試料濃度換算することにより推定した総ヒ素分析法の定量下限値は 0.06 mg/kg であった。有機ヒ素形態別分析法における標準溶液 0.01 µg/mL のクロマトグラムを図 1 に、繰り返し測定の数値及び推定した定量下限値を表 5 に示す。

表 4 総ヒ素分析の ICP-MS 条件

装置	ICP-MS 7700e (Agilent Technology 社製)
RF パワー	1,550 W
プラズマガス (Ar)	15 L/min
キャリアガス (Ar)	1 L/min
反応ガス (He)	4.3 mL/min
測定モード	He モード
測定法	内部標準法
測定元素 (質量数)	As (75), Ga (71)

3.2 分析法の性能評価

認証試料の一回分析値と AB に付与されていた認証値を比較した結果から、有機ヒ素形態別分析法の AB を対象とした真度は 78% と推定された。

ハマチ 2.0 g に 6 種の有機ヒ素化合物を各 10 µg 添加することで添加試料を調製し、その分析結果から有機ヒ素形態別分析法の回収率を検証した。その結果、TMAO の回収率は 13% と低かったが、MMA, DMA, TeMA, AB, AC の回収率は、それぞれ 61%, 47%, 116%, 110%, 85% となり、理想的な回収率である 100% に比較的近い値であった。なお、ICP-MS を用いた総ヒ素分析法については、認証試料の分析結果から真度が 102% と推定された。また、ハマチ 0.20 g に総ヒ素量として 6 µg となるヒ素標準溶液を添加し調製した添加試料の分析結果からは、回収率が 109% となった。認証試料認証試料分析による真度及び添加試料分析による回収率を表 6 に示す。

有機ヒ素形態別分析法に従ってハマチから調製した溶液に 0.1 µg/mL となるよう有機ヒ素化合物の標準溶液を添加して測定し、得られた測定値と規定濃度との比を求めた結果、MMA では 103%, DMA では 114%, TMAO では 37%, TeMA では 112%, AB では 110%, AC では 73% であった。これらの結果から、TMAO での回収率が低くなる主要因は、LC-MS/MS 測定における試料由来の

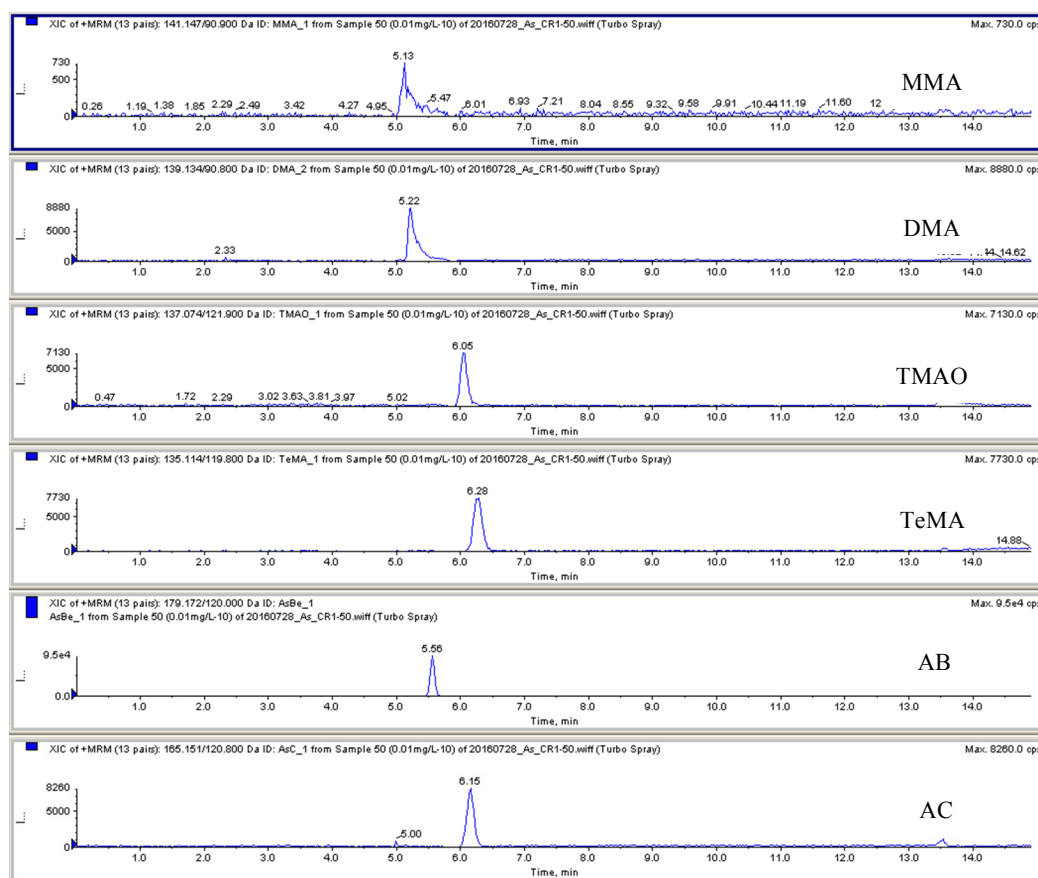


図 1 有機ヒ素形態別分析法における標準溶液 0.01 µg/mL のクロマトグラム

表5 有機ヒ素形態別分析法及び総ヒ素分析法の定量下限値推定

		MMA	DMA	TMAO	TeMA	AB	AC	総ヒ素
標準溶液濃度 ($\mu\text{g/mL}$)		0.01	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	空試験溶液
測定値	1回目	0.008037	0.001767	0.000710	0.000851	0.000715	0.001712	0.000022
	2回目	0.010157	0.001407	0.000773	0.000783	0.000679	0.001781	0.000020
	3回目	0.009081	0.001362	0.000692	0.000902	0.000663	0.001641	0.000018
	4回目	0.009994	0.001182	0.000554	0.000860	0.000669	0.001711	0.000018
	5回目	0.008510	0.001182	0.000637	0.000749	0.000645	0.001647	0.000017
	6回目	0.008543	0.001003	0.000712	0.000843	0.000635	0.001657	0.000016
	7回目	0.007728	0.001003	0.000591	0.000792	0.000607	0.001714	0.000015
	8回目	0.008624	0.001033	0.000682	0.000885	0.000519	0.001651	0.000016
	9回目	0.006945	0.001092	0.000536	0.000783	0.000578	0.001705	0.000015
	10回目	0.006700	0.001227	0.000706	0.000809	0.000658	0.001674	0.000016
10×標準偏差		0.011428	0.002363	0.000771	0.000499	0.000562	0.000437	0.000023
試料濃度換算した 定量下限値 (mg/kg)		1	0.2	0.08	0.05	0.06	0.04	0.06

表6 分析法の性能評価

	MMA	DMA	TMAO	TeMA	AB	AC	総ヒ素
認証試料による推定真度 (%)	(-)	(-)	(-)	(-)	78	(-)	102
添加試料の回収率 (%)	61	47	13	116	110	85	109

(-) ; 認証値なし

成分によるイオン化阻害だと考えられた。また、MMA及びDMAの測定ではイオン化阻害が認められなかったことから、これら2化合物の回収率が低くなる主要因は、試料からの抽出効率が低かったためと考えられた。

3.3 海産物試料の分析

2.1に示す海産物について、回収率が低かったTMAOを除く5種の有機ヒ素化合物及び総ヒ素の分析を行った(表7)。魚介類8試料のすべてからABが検出され、濃度はヒ素として0.86 mg/kg~5.2 mg/kgであった。Uneyamaらがまとめた世界各地で調査された魚介類のAB濃度はヒ素として0.25~16 mg/kgであり¹⁾、今回の結果はその範囲内であった。また、メバルからTeMAが検出され、濃度はヒ素として0.25 mg/kgであった。魚介類8試料の形態別ヒ素濃度及び総ヒ素濃度を図2に示す。いずれの試料もAB量が総ヒ素量の5割程度を占めていた。今回の結果は魚種ごとに1試料ずつ分析したものであり、魚種とヒ素濃度の関係に言及するためには試料数を増やして検討を行う必要がある。

一方、福岡市の特産品であるおきょうについては、有機ヒ素化合物5種と総ヒ素濃度は7試料いずれも定量下限値未満であった。

本研究は、一部を平成27年度厚生労働省科学研究費補助金(食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価とその手法開発に関する研究)により実施した。また、本研究内容は第53回全国衛生化学技術協議会年會

表7 魚介類試料中の形態別ヒ素濃度(ヒ素として)

	MMA	DMA	TeMA	AB	AC	総ヒ素
サワラ	(-)	(-)	(-)	0.86	(-)	2.5
ハマチ	(-)	(-)	(-)	1.6	(-)	2.6
マアジ	(-)	(-)	(-)	1.8	(-)	2.8
メバル	(-)	(-)	0.25	2.0	(-)	3.4
マダイ	(-)	(-)	(-)	1.7	(-)	4.9
ウマヅラハギ	(-)	(-)	(-)	3.1	(-)	5.6
イサキ	(-)	(-)	(-)	4.2	(-)	7.6
スルメイカ	(-)	(-)	(-)	5.2	(-)	8.3

(-) ; 定量下限値未満 (mg/kg)

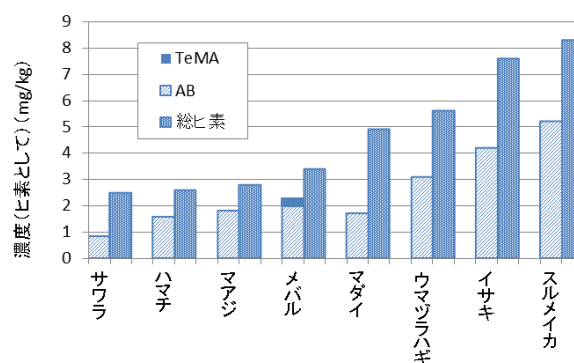


図2 魚介類中の形態別ヒ素濃度(ヒ素として)

²⁾にて一部発表済みである。

文献

- 1) C. uneyama et al. : Arsenic in various foods: Cumulative data, Food Additives and Contaminants, 24 (5), 447~

534, 2007

2) 戸渡寛法, 他: 福岡市近海で漁獲される魚介類中のヒ

素濃度について, 第53回全国衛生化学技術協議会年会
講演集, 76~77, 2016