

分 担 研 究 報 告

メチル水銀試験法の改良と鯨肉中水銀分布調査への応用

米谷 民雄

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
分担研究報告書

メチル水銀試験法の改良と鯨肉中水銀分布調査への応用
分担研究者 米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

研究要旨

妊婦等に対する特定魚介類の摂取制限勧告がされているなかで、魚介類中のメチル水銀分析法のもつ意味は大きい。現在の公定法は昭和 48 年に通知された方法で、直接ベンゼンで抽出する方法である。しかし、この方法には抽出過程でエマルジョンが形成されるなど、問題点がある。そこで、公定法をベースにし、タンパク質の影響を軽減する目的でアルカリ/エタノール分解を、あるいは脂肪分除去の目的でアセトン・トルエン処理をした後、ベンゼンのかわりにトルエンを使用して塩酸酸性下にてメチル水銀の抽出及び再抽出をする方法について検討を行った。その結果、アセトン・トルエン処理を加えた抽出法では塩化メチル水銀の添加回収率は 85.9%に上昇したが、アルカリ/エタノール分解を加えた場合は 70%台であり、また、総水銀に対するメチル水銀の含有率はすべて 80%程度であった。これらの結果から、次年度は、錯形成剤としてシステイン・アセテートではなく、環境省法でも採用しているジチゾンを用いた方法も検討すべきと考えられた。

研究協力者

板野一臣：大阪市立環境科学研究所食品保健課研究副主幹

長岡（浜野）恵：国立医薬品食品衛生研究所食品部主任研究官

A. 研究目的

2000 年に米国 National Research Council がメチル水銀の健康影響に関する報告を議会に提出したのをきっかけに、2001 年にはメチル水銀による健康影響（特に胎児毒性）の観点から、FDA は妊婦等が特定の種類の魚介類を摂取するのを制限するように勧告を出した¹⁾。その後、各国が勧告を出したが、わが国も 2003 年 6 月 3 日に「水銀を含有する魚介類等の摂食に関する注意事項」を出した²⁾。また、2004

年 3 月には JECFA がメチル水銀の PTWI（暫定耐容週間摂取量）を 3.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/週から 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/週に変更した（ただし、総水銀の PTWI は 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/週のまま継続されている）。

このような状況のもとで、魚介類中のメチル水銀分析法のもつ意味が大きくなっている。現在の厚生労働省公定法³⁾は、塩酸酸性ベンゼン抽出－システイン・アセテート溶液転溶－塩酸酸性ベンゼン再抽出－パックドカラム-ECD-GC によるものであるが、この方法では抽出過程でエマルジョンが形成され、メチル水銀の濃度が低くでるとの指摘がなされている。エマルジョンの形成には試料中のタンパク質や脂肪等が関与しているとされており、分析に際しては、これら試料成分の影響をできるだ

け排除する必要がある。また、メチル水銀の抽出溶媒や再抽出溶媒としてベンゼンやクロロホルムを使用することは、人への健康影響や排水基準の観点から問題がある。

そこで本研究では、従来法をベースにタンパク質の影響を軽減する目的でアルカリ/エタノール処理⁴⁾をした後、あるいは脂肪分の除去を目的にアセトン・トルエン処理⁵⁾をした後、塩酸酸性下におけるメチル水銀の抽出溶媒及び再抽出溶媒としてトルエンを使用する分析法について検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料・試薬

試料はメバチマグロ 3 試料及びサバ 1 試料の筋肉部を用いた。

メチル水銀の測定には残留農薬分析用の試薬を、総水銀の測定には日本インスツルメンツ社製の添加剤を用いた。

2. 装置及び器具

2.1 塩化メチル水銀

GC : Agilent Technologies 5890 SERIES II (ECD)

カラム: ULBON HR-Thermon-Hg (0.53 mm×15 m)

カラム温度 : 100 °C (1 min)・10 °C /min・160 °C (5 min)

注入口温度 : 200 °C

検出器温度 : 230 °C

キャリアガス : He (8~10 ml/min)

注入量 : 2 µl

2.2 総水銀

半自動微量水銀分析装置 : 日本インスツルメンツ社製 [試料加熱気化・金アマルガ

ム捕集装置 (マーキュリー/MA-1S)、水銀検出装置 (マーキュリー/MD-1)]

3. 分析法

3.1 メチル水銀分析法

抽出法 I

アルカリ/エタノール処理-塩酸酸性トルエン抽出-システイン・アセテート溶液転溶-塩酸酸性トルエン再抽出-キャピラリーカラム・ECD・GC 法を検討した (図 1 にフローチャートを示す)。

抽出法 II

アセトン・トルエン処理-塩酸酸性トルエン抽出-システイン・アセテート溶液転溶-塩酸酸性トルエン再抽出-キャピラリーカラム・ECD・GC 法を検討した (図 2 にフローチャートを示す)。

塩化メチル水銀濃度計算法

塩化メチル水銀濃度 (µg/g) = A (µg/ml) × B × D / C × 1/E

A : 検量線より求めた塩化メチル水銀濃度 (水銀として) µg/ml

B : 最終段階で分画に使用したトルエン量 ml

C : 分離回収システイン・アセテート溶液量 ml

D : システイン・アセテート溶液添加量 ml

E : 試料採取量 g

塩化メチル水銀の検量線作成方法

検量線 : 塩化メチル水銀高濃度溶液 ((水銀として 1000 µg/ml) から希釈し、0.005 ~ 0.1 µg/ml の標準溶液を段階的に作成した)。

3.2 総水銀

日本インスツルメンツ社製半自動微量水銀分析装置で分析した。

メバチマグロは均一試料約 1 g を精秤し、

1 mol/L 水酸化カリウム溶液に溶解後、10 ml として試験溶液とした。マサバは均一試料約 100 mg を精秤し、試験用の試料とした。

C. 研究結果

1. 塩化メチル水銀のガスクロマトグラム及び検量線

ULBON HR-Thermon-Hg (0.53 mm × 15 m) キャピラリーカラムを用いて測定した。カラム温度を 160°C 一定条件で測定したところ塩化メチル水銀のカラム分離及びピーク形状が悪かったが、カラム温度を 100°C から 160°C まで 10°C/分の昇温条件で測定することによりそれらが改善された。塩化メチル水銀標準溶液 (0.1 µg/ml) のガスクロマトグラムを図 3 に示す。

図 4 は塩化メチル水銀のピーク面積を用いた検量線を示したものである。ピーク面積を用いた検量線は 0.005~0.1 µg/ml の範囲で良好な直線性 ($R^2=0.9998$) を示した。ピーク高を用いた検量線もピーク面積と同様に良好な直線性を示したが、ピーク面積と比較するとやや劣っていた。

2. 抽出法 I におけるトルエン抽出工程までの塩化メチル水銀の回収率

1% システイン溶液 (塩酸 L-システイン 1.0 g、酢酸ナトリウム 0.8 g を水に溶解して 100 ml としたもの) 5 ml に塩化メチル水銀/エタノール溶液 (50 µg/ml) 100 µl を添加 (水銀として 5 µg) し、図 1 に従ってアルカリ分解、中和後、塩酸を加えて溶液中の塩酸濃度を 1.5 mol/L、2.8 mol/L 及び 4 mol/L に調整した。各塩酸濃度溶液からトルエン 30 ml で 3 回抽出し、塩化メチル水銀の回収率を比較した。表 1 に示すよ

うに、1.5 mol/L、2.8 mol/L 及び 4 mol/L 塩酸濃度の間に大きな相違は見られないが、1.5 mol/L 塩酸濃度で僅かながら低かった (96.6%) ことから、トルエンによる抽出は 3 mol/L 塩酸濃度で行うことにした。

3. 抽出法 I におけるトルエン抽出溶液から最終工程までの塩化メチル水銀の回収率

トルエン 90 ml に塩化メチル水銀/トルエン溶液 (20 µg/ml) 100 µl を添加 (水銀として 2 µg) し、塩化ナトリウム溶液で洗浄後、システイン・アセテート溶液 15 ml (塩酸 L-システイン 1.0 g、酢酸ナトリウム 0.8 g、無水硫酸ナトリウム 12.5 g を水に溶解して 100 ml としたもの) に転溶した。システイン・アセテート溶液 2.5~3 ml を採取し、2 mol/L、3 mol/L 及び 4 mol/L の塩酸溶液としてから、それぞれトルエン 4 ml で再抽出し、塩化メチル水銀の回収率を比較した。表 2 に示すように、3 mol/L 塩酸濃度が 98.5% と最も高い回収率を示したことから、システイン・アセテート溶液からのトルエンによる再抽出は 3 mol/L 塩酸濃度で行うことにした。

4. 抽出法 I による魚肉からの塩化メチル水銀の添加回収率

メバチマグロ 1 及びマサバの筋肉部からの塩化メチル水銀の回収率を表 3-1 に示した。メバチマグロは試料 1 g あたり塩化メチル水銀 (水銀として) 1 µg、マサバは試料 1 g あたり塩化メチル水銀 (水銀として) 0.2 µg を添加した。塩化メチル水銀の添加回収率はメバチマグロ 73.6%、マサバ 72.9% であり、魚種、添加量による大きな相違はみられなかった。

トルエン抽出液からシステイン・アセテ

ート溶液への転溶操作においてエマルジョンの形成が認められた。タンパク質とともにエマルジョン形成の主要な原因となる脂肪分の除去を行う目的で、図1において2 mol/L 塩酸 10 ml を加えた後、ヘキサン 25 ml による 10 分間の振とう処理を加えた。ヘキサンを除去し、硫酸銅溶液を加える操作以降から再度図1に従った。メバチマグロー1 試料においてヘキサン処理を行ったところ、表3-1に示したメバチマグロ中の塩化メチル水銀濃度が約 38% 減少した(表3-2)。ヘキサン等により脂肪分を除去する場合は、アルカリ処理より前に行う必要があることが示唆された。

5. 抽出法 I による魚肉中の総水銀に占めるメチル水銀の含有率

表4はメバチマグロー1、メバチマグロー2及びマサバの筋肉部中の総水銀に対するメチル水銀の含有率を示したものである。メバチマグロの総水銀濃度は 0.844~0.995 $\mu\text{g/g}$ 、マサバは 0.0493 $\mu\text{g/g}$ と非常に異なるが、総水銀中のメチル水銀の含有率は 77.9~80.8% であり、大きな相違はみられなかった。

6. 抽出法 II におけるトルエン抽出時の塩酸濃度の影響

図2に従ってアセトン、トルエン処理したメバチマグロー3の筋肉部に 6 mol/L、7.5 mol/L 及び 9 mol/L 塩酸溶液 2.5 ml を加え、それぞれトルエン 20 ml で一回抽出し、トルエンの一部を用いて GC 分析した結果を表5に示した。検出された塩化メチル水銀量(水銀として)は塩酸濃度に関係なく 1.64~1.65 $\mu\text{g/g}$ であった。しかし、トルエン回収量は 6 mol/L 塩酸溶液で 9.5~10.5 ml、7.5 mol/L 塩酸溶液で 4~5 ml、

9 mol/L 塩酸溶液で 19 ml 以上であった。試料 1 g に 9 mol/L 塩酸溶液 2.5 ml 加えた場合、エマルジョンの形成はほぼ抑制されたことから、トルエン抽出時の塩酸濃度は 9 mol/L とした。トルエン抽出量を 25 ml、30 ml 及び 35 ml と増加させても塩化メチル水銀の検出量はほとんど変化しなかった。

7. 抽出法 II によるシステイン溶液に添加した塩化メチル水銀の回収率

塩化メチル水銀/トルエン溶液 (100 $\mu\text{g/ml}$) 1 ml を 1%システイン溶液 10 ml で振とう抽出し、その 100 μl を採取し(水銀として 1 μg)、図2の 9 mol/L 塩酸溶液を加える操作以降から同様に処理した。塩化メチル水銀の回収率は 93.1% であった(表6)。

8. 抽出法 II によるメバチマグロ筋肉部からの塩化メチル水銀の添加回収率

メバチマグロー1の筋肉部からの塩化メチル水銀の添加回収率を表7に示した。アセトン、トルエン処理後、メバチマグロ 1 g に塩化メチル水銀(水銀として) 1 μg を添加した。塩化メチル水銀の添加回収率は 85.9% であった。抽出法 I では塩化メチル水銀の回収率は 72.9~73.6% であり、抽出法 II ではメバチマグロのみであるが抽出法 I と比較してやや高い回収率を示した。抽出法 II では抽出法 I と異なって全行程を通してエマルジョン形成が抑制されており、これが回収率に影響している可能性が考えられた。

9. 抽出法 II によるメバチマグロ筋肉部中の総水銀に占めるメチル水銀の含有率

表8はメバチマグロー1の筋肉部中の、総水銀に対するメチル水銀の含有率を示

したものである。総水銀中のメチル水銀の含有率は83.5%であった。抽出法Ⅰと抽出法Ⅱは塩化メチル水銀の添加回収率に関しては相違を示したが、総水銀中のメチル水銀の含有率は大きな相違を示さなかった。これらの結果は、システインに結合したメチル水銀では魚肉タンパク質に結合したメチル水銀と比較して塩酸酸性条件下でのトルエンへの抽出率が諸条件の要因により変動する可能性を示唆しているものと考えられた。

D. 考察

現在の公定法は昭和48年環乳第99号で示された古い方法で、塩酸酸性ベンゼン抽出—システイン・アセテート溶液転溶—塩酸酸性ベンゼン再抽出—パックドカラム・ECD・GCによるものである。ベンゼン直接抽出ではエマルジョンが形成されるため、従来から問題となっていたが、未だ改定されていない。

一方、1991年に刊行された厚生省生活衛生局監修「食品衛生検査指針理化学編」⁶⁾においては、環境庁の赤木氏が開発した分析法が記載されており、基本的に同じ方法が平成17年3月の改訂版⁷⁾にも記載されている。また、その方法に準じた方法が「水銀分析マニュアル」⁸⁾として平成16年3月に環境省から出されている。同マニュアルにおける方法のフローチャートを図5と図6(簡便法)に示しておく。

その他の分析法としては、マイクロ波やKOH/MeOHで分解後、アルキル化やフェニル化を行い、GC-MS等で分析する誘導体化-GC法⁹⁾などがある。

今年度は、システイン・アセテートを用いる公定法をベースに、エマルジョン形成を防ぐために、タンパク質の影響を軽減するためのアルカリ/エタノール処理と、脂肪除去の目的のアセトン・トルエン処理の効果を検討した。その結果、アセトン・トルエン処理を加えた抽出法Ⅱによる塩化メチル水銀の添加回収率は85.9%に上昇したが、アルカリ/エタノール処理では70%台であった。しかし、総水銀に対するメチル水銀の含有率は、どちらも80%程度であった。

平成15年6月3日に「水銀を含有する魚介類等の摂食に関する注意事項」を發した農事・食品衛生審議会食品衛生分科会乳肉水産食品・毒性合同部会での資料においては、公定法を用いた「水産庁における実態調査結果(調査結果の概要)」(資料No. 3-3)¹⁰⁾では、メチル水銀/総水銀比はメチル水銀がN.D.のデータを除いても60%であるのに対し、その他の参考資料として提出された、環境省法に準じた方法によると考えられる「国立水俣病総合研究センターでの総水銀及びメチル水銀の検査結果」¹¹⁾では93%と高い値が報告されている。今回の改良で、メチル水銀/総水銀比の改善は認められたが、未だ環境省法での値と比べると低い。そのため、次年度においては、錯形成剤としてシステイン・アセテートではなく、環境省法で採用されているジチゾンを用いる方法も検討すべきと考えられた。

E. 結論

1) 従来法をベースに、アルカリ/エタノール前処理あるいはアセトン・トルエン前処

理を加えて、メチル水銀試験法の改良を試みた。

2) アルカリ/エタノール前処理を加えた抽出法 I によるメバチマグロ及びマサバ筋肉部からの塩化メチル水銀の添加回収率は、それぞれ 73.6%、72.9%であった。

3) アセトン・トルエン前処理を加えた抽出法 II によるメバチマグロ筋肉部からの塩化メチル水銀の添加回収率は、85.9%であった。

4) 抽出法 I によるメバチマグロ及びマサバ筋肉部中の総水銀に対するメチル水銀の含有率は 77.9~80.8%、抽出法 II によるメバチマグロ筋肉部中の総水銀に対するメチル水銀の含有率は 83.5%であり、両抽出法間に大きな相違はなかった。

5) 今後はシステイン・アセテートではなく、ジチゾンを用いる方法も検討すべきと考えられた。

F. 参考文献

- 1) <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/admehg.html>
- 2) <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2003/06/s0603-3.html>
- 3) 「魚介類の水銀の暫定的規制値について」(昭和 48 年 7 月 23 日環乳第 99 号) の別紙 2
- 4) 竹内正博ら：東京衛研年報 25, 133-139 (1974)
- 5) S. C. Hight and M. T. Corcoran, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70, 24-30 (1987)
- 6) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針理化学編 (1991) (社) 日本食品衛生協会
- 7) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針理化学編 (2005) (社) 日本食品衛生協会

8) <http://www.env.go.jp/chemi/report/h15-04/>

9) S.-S. Chen et al., J. Chromatogr. A, 1024, 209-215 (2004); L. Yang et al., J. Chromatogr. A, 1011, 135-142 (2003); R. Rodil et al., J. Chromatogr. A, 963, 313-323 (2002); N. Demuth and K. Heumann, Anal. Chem., 73, 4020-4027 (2001)

10) <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2003/06/s0603-4g.html>

11) <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2003/06/s0603-4x.html>

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

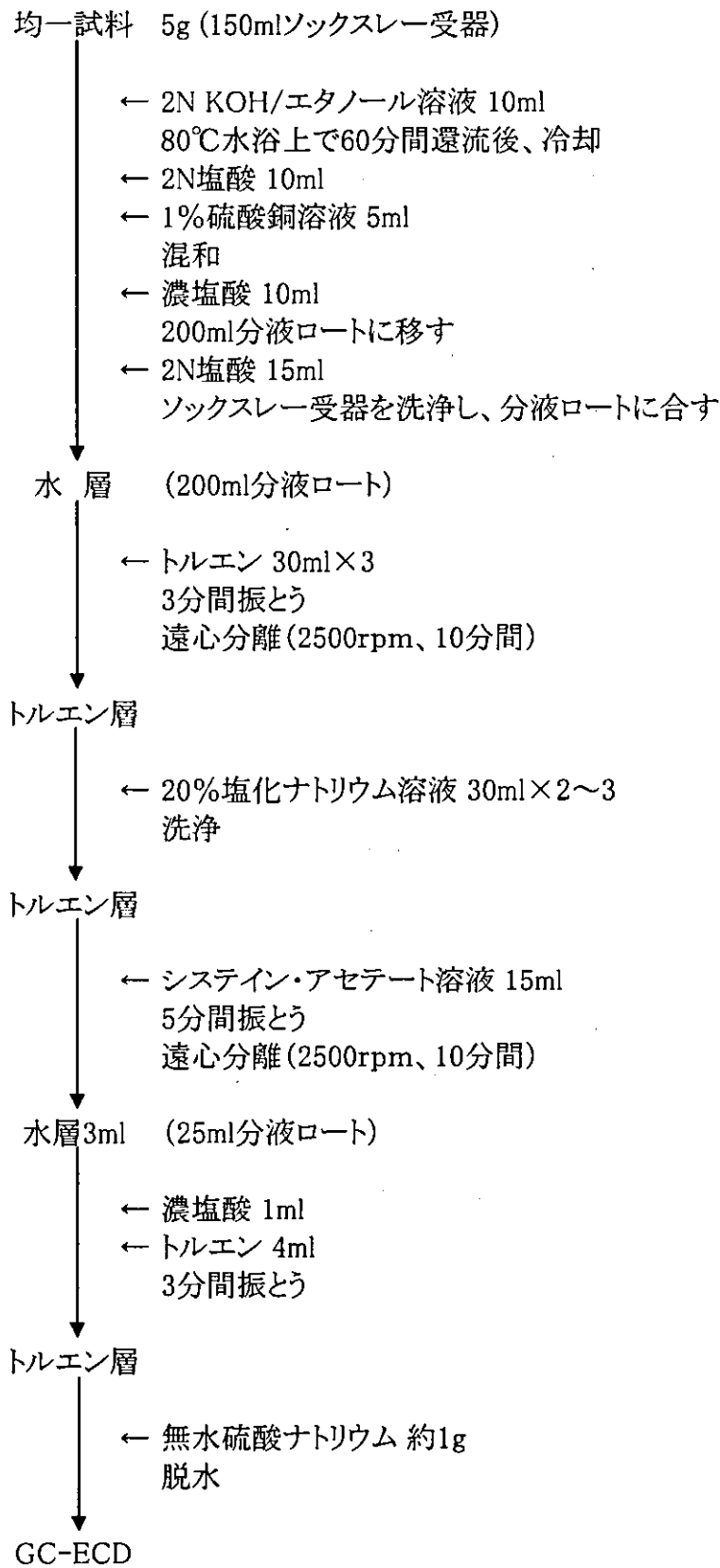


図1 食品中のメチル水銀の抽出法 I

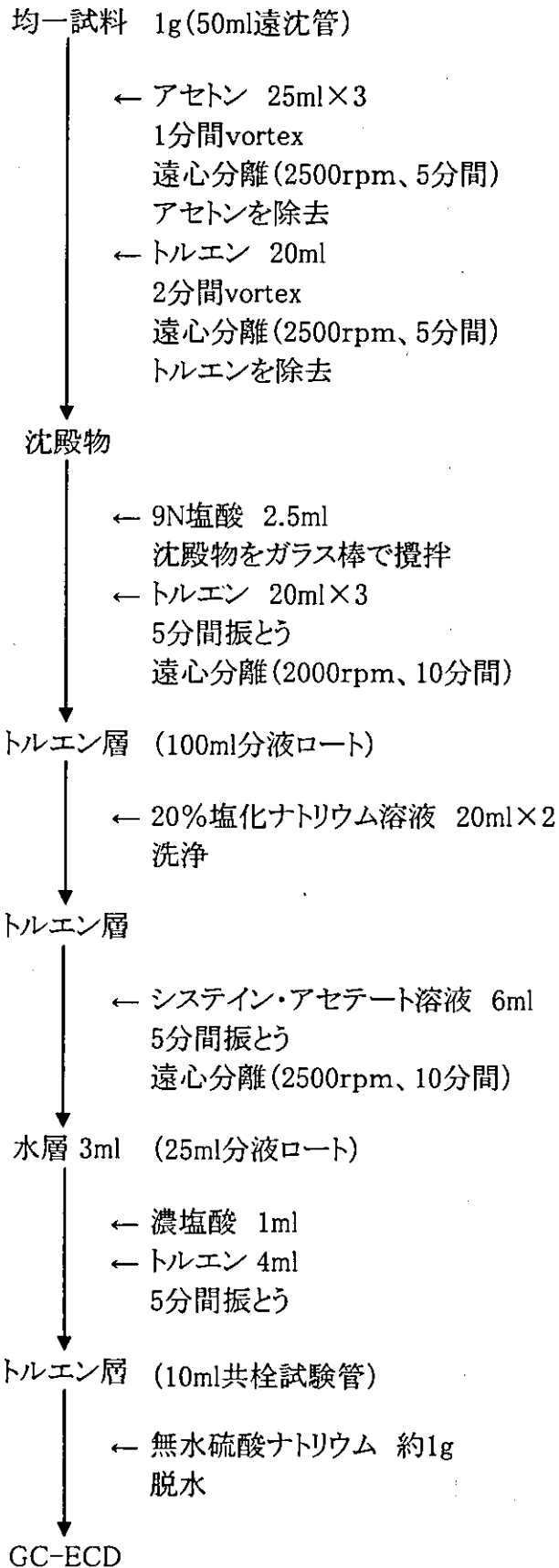


図2 食品中のメチル水銀の抽出法Ⅱ

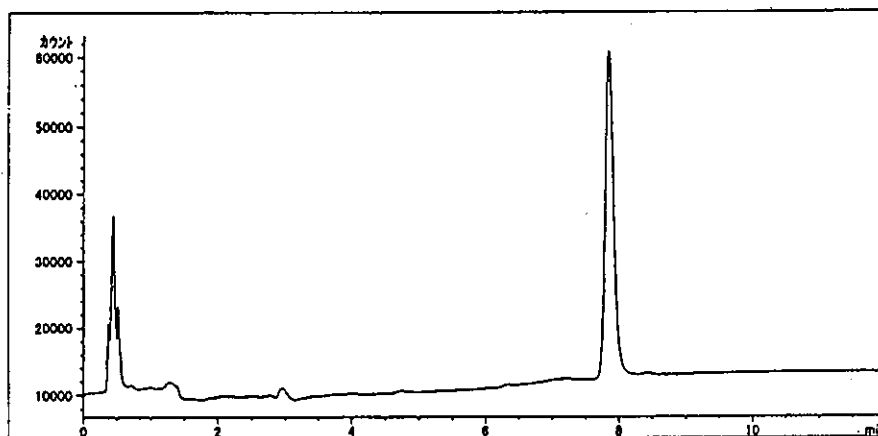


図3 塩化メチル水銀標準用液(0.1 μg/ml)のガスクロマトグラム

メチル水銀濃度(μg/ml)	0.005	0.01	0.025	0.05	0.1
ピーク面積	20788	39418	100860	213947	428393

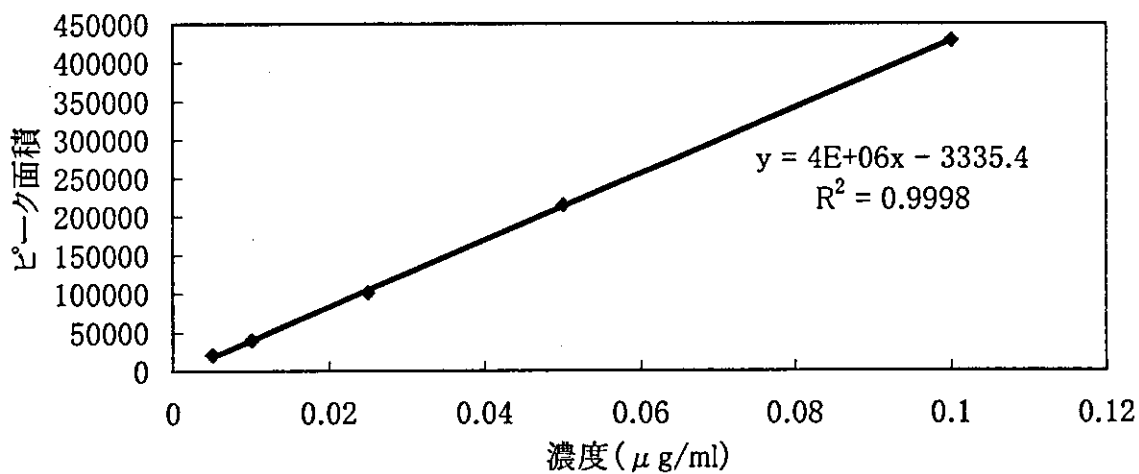


図4 塩化メチル水銀の検量線

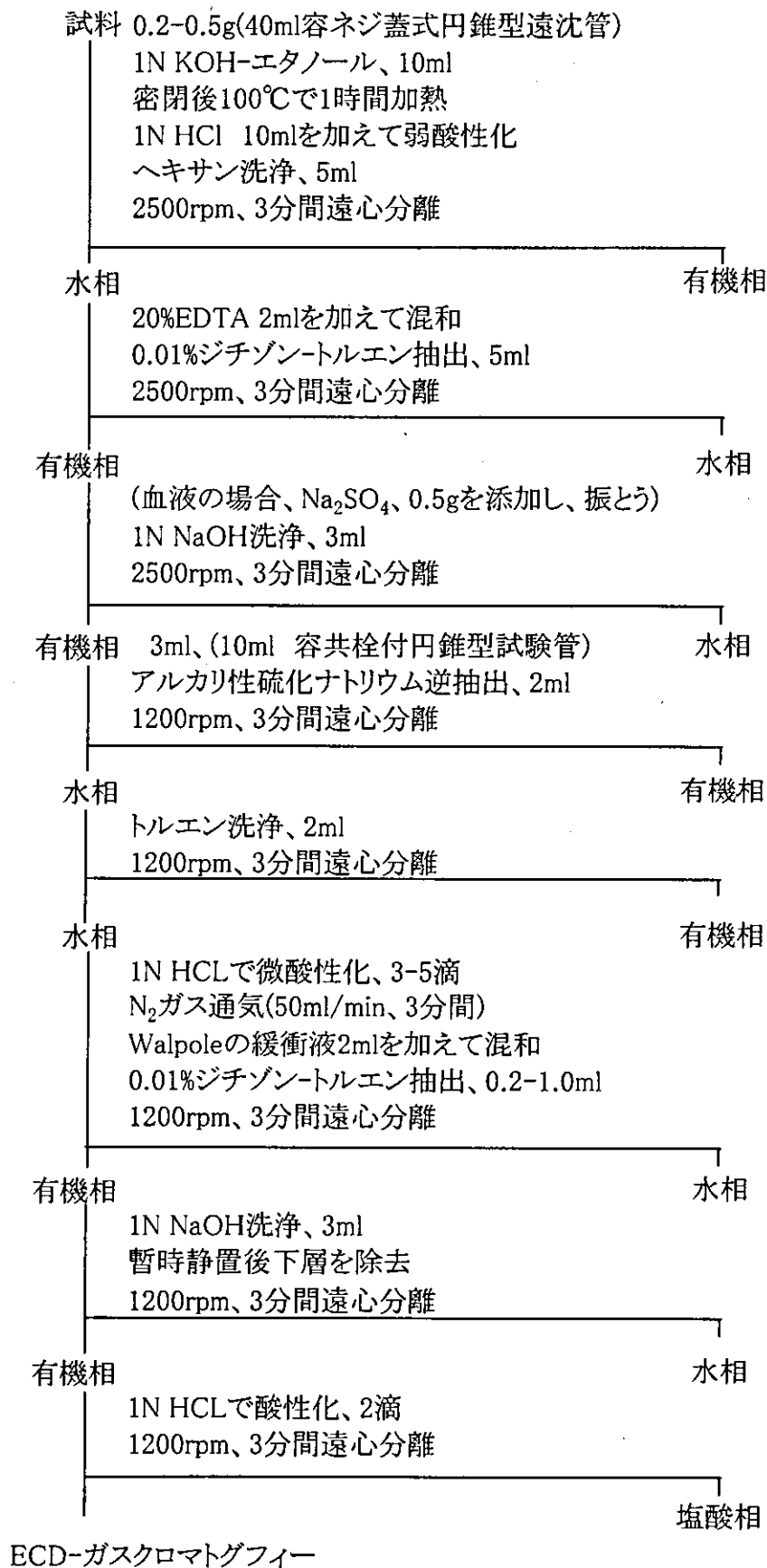


図5.環境省「水銀分析マニュアル」の方法



図6.環境省「水銀分析マニュアル」の簡便法⁷⁾

表1. 塩化メチル水銀抽出における塩酸濃度の影響

	塩化メチル水銀検出量(水銀として μg)		
塩酸濃度(規定)	1.5	2.8	4
添加量(μg)	5.00	5.00	5.00
実験番号 -1	4.81	4.91	4.90
-2	4.84	4.96	4.99
-3	4.83	4.93	4.92
平均値 \pm S. D.	4.83 \pm 0.015	4.93 \pm 0.025	4.94 \pm 0.047
C. V. %	0.300	0.507	0.951
平均回収率(%)	96.6	98.6	98.8

表2 システイン・アセテート溶液からの塩化メチル水銀抽出における塩酸濃度の影響

	塩化メチル水銀検出量(水銀として μg)		
塩酸濃度(規定)	2	3	4
添加量(μg)	2.00	2.00	2.00
実験番号 -1	1.77	1.97	1.90
-2	1.85	1.97	1.91
-3	1.81	1.97	1.91
平均値 \pm S. D.	1.81 \pm 0.040	1.97 \pm 0.000	1.91 \pm 0.006
C. V. %	2.21	0	0.314
平均回収率(%)	90.5	98.5	95.3

表3-1 魚肉からの塩化メチル水銀の添加回収率

魚種/採取量	塩化メチル水銀検出量(水銀として μg)			
	メバチマグロー1 5g		マサバ 5g	
添加量(μg)	0	5.00	0	1.00
試料番号 -1	3.91	7.52	0.196	0.946
-2	4.01	7.80	0.187	0.896
-3	4.15	7.80	0.191	0.917
-4	3.89	7.60	0.196	0.927
-5	4.15	7.78	0.188	0.921
平均値 \pm S. D.	4.02 \pm 0.126	7.70 \pm 0.132	0.192 \pm 0.0043	0.921 \pm 0.0180
C. V. (%)	3.13	1.71	2.24	1.95
平均回収率(%)	73.6		72.9	

表3-2 アルカリ分解・中和・ヘキサン処理後の塩化メチル水銀の検出量

	塩化メチル水銀検出量(μg)	
	メバチマグロー1 5g	
	無	有
ヘキサン処理		
実験番号 -1	3.91	2.48
-2	4.01	2.49
-3	4.15	2.46
-4	3.89	
-5	4.15	
平均値 \pm S. D.	4.02 \pm 0.126	2.48 \pm 0.013
C. V. (%)	3.12	0.536

表4 魚肉中の総水銀に対するメチル水銀の含有率

魚種	水銀検出量(μg/g)					
	メバチマグロー1		メバチマグロー2		マサバ	
水銀の形態	総水銀	メチル水銀	総水銀	メチル水銀	総水銀	メチル水銀
試料番号-1	0.990	0.781	0.850	0.641	0.0498	0.0393
-2	0.995	0.801	0.836	0.676	0.0487	0.0375
-3	0.999	0.830	0.846	0.679	0.0495	0.0382
-4		0.778		0.683		0.0393
-5		0.829		0.670		0.0375
平均値±S. D.	0.995±0.0045	0.804±0.0251	0.844±0.0072	0.670±0.0168	0.0493±0.000570	0.0384±0.00090
C. V. (%)	0.452	3.12	0.853	2.51	1.16	2.34
メチル水銀含有率(%)	80.8		79.4		77.9	

表5 トルエン20mlによる塩化メチル水銀抽出における塩酸濃度の影響

	塩化メチル水銀検出量(水銀として $\mu\text{g/g}$)		
魚種/採取量	メバチマグロー3 1g		
塩酸濃度(規定)	6	7.5	9
実験番号 -1	1.63	1.63	1.65
-2	1.65	1.63	1.66
-3	1.66	1.65	1.63
平均値 \pm S. D.	1.65 \pm 0.015	1.64 \pm 0.012	1.65 \pm 0.015
C. V. %	0.909	0.732	0.909
トルエン回収量(ml)	9.5~10.5	4~5	>19

表6 システイン溶液に添加した塩化メチル水銀の回収率

塩化メチル水銀検出量(水銀として μg)	
添加量(μg)	1.00
実験番号 -1	0.939
-2	0.924
-3	0.932
平均値 \pm S. D.	0.931 \pm 0.0078
C. V. %	0.839
平均回収率(%)	93.1

表7 メバチマグロ筋肉部からの塩化メチル水銀の添加回収率

魚種/採取量	塩化メチル水銀検出量(水銀として μg)	
	メバチマグロ-1 1g	
添加量 (μg)	0	1.00
試料番号 -1	0.826	1.699
-2	0.831	1.712
-3	0.826	1.664
-4	0.841	1.689
-5	0.830	1.687
平均値 \pm S. D.	0.831 ± 0.0061	1.690 ± 0.0177
C. V. (%)	0.734	1.05
平均回収率 (%)	85.9	

表8 メバチマグロ筋肉部中の総水銀に対するメチル水銀の含有率

魚 種	水銀検出量 ($\mu\text{g/g}$)	
	メバチマグロー1	
水銀の形態	総水銀	メチル水銀
試料番号 -1	0.990	0.826
-2	0.995	0.831
-3	0.999	0.826
-4		0.841
-5		0.830
平均値 \pm S. D.	0.995 \pm 0.0045	0.831 \pm 0.0061
C. V. (%)	0.452	0.734
メチル水銀含有率(%)	83.5	

分 担 研 究 報 告

カビ毒同時試験法開発と分布調査研究

小西 良子