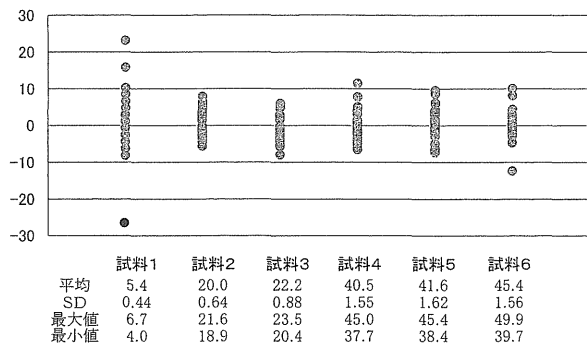
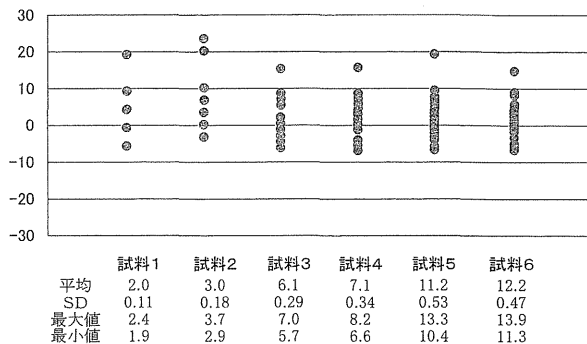


測定値散布図(1)

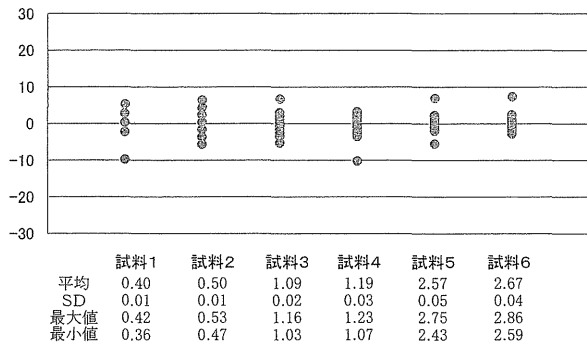
(%) 血中鉛量(Pb-B) (参加施設数: 39)



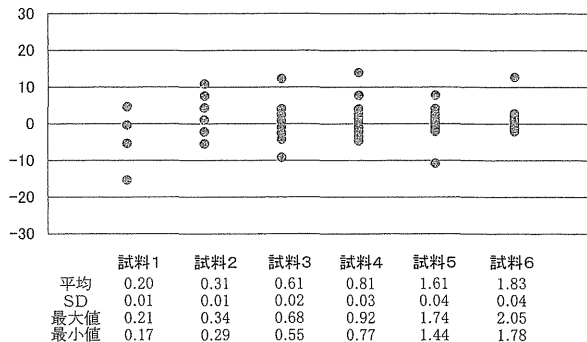
(%) 尿中デルタアミノレブリン酸量(ALA) (参加施設数: 39)



(%) 尿中馬尿酸量(HA) (参加施設数: 39)



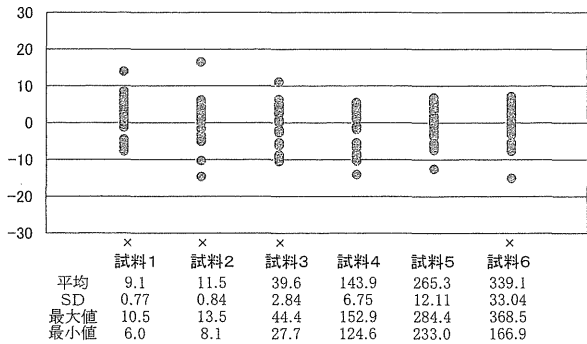
(%) 尿中メチル馬尿酸量(MHA) (参加施設数: 39)



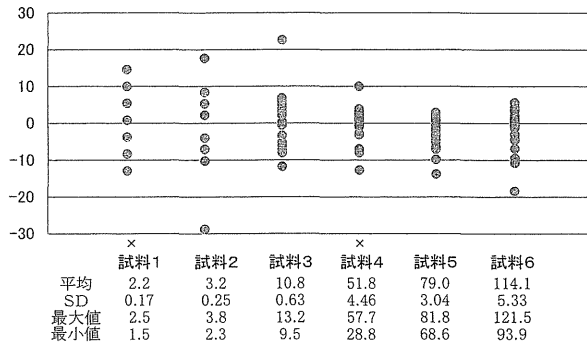
※30%もしくは-30%を超えている場合は【×】が表示されています。

測定値散布図(2)

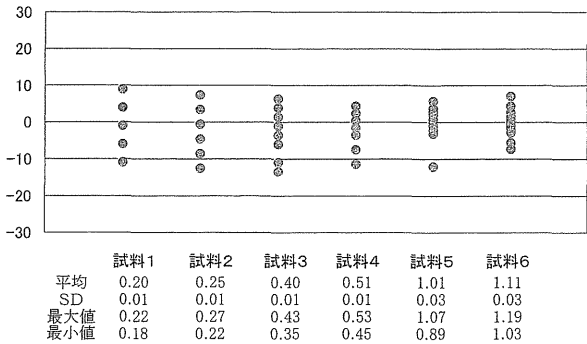
(%) 尿中総三塩化物量(TTC) (参加施設数: 37)



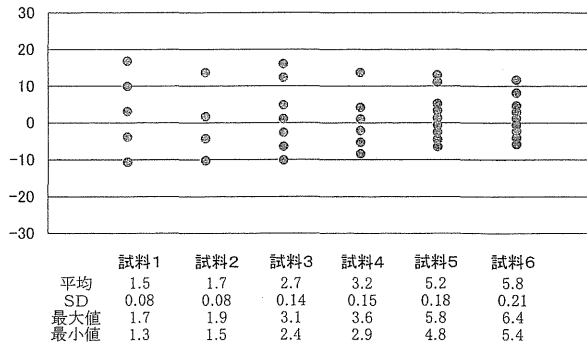
(%) 尿中トリクロル酢酸量(TCA) (参加施設数: 35)



(%) 尿中マンデル酸量(MA) (参加施設数: 39)



(%) 尿中2,5-ヘキサジオン量(HD) (参加施設数: 38)



※30%もしくは-30%を超えている場合は【×】が表示されています。

図 自施設検査施設の検査項目別偏差

表5 外部委託施設の項目別評価点別施設数

評価点	Pb-B		ALA		HA		MHA	
100～85	305	100.0%	305	100.0%	307	100.0%	305	99.3%
85～70	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	2	0.7%
70～60	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%
59～ 0	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%
評価点	TTC		TCA		MA		HD	
100～85	100.0%		305	100.0%	305	100.0%	305	99.7%
85～70	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	1	0.3%
70～60	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%
59～ 0	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%

表6 全参加施設の総合評価点によるランク別施設数

ランク	平成 24 年度		平成 23 年度		平成 22 年度	
	全参加施設数	比率 (%)	全参加施設数	比率 (%)	全参加施設数	比率 (%)
A (評価合計点の平均が 85 点以上)	345	99.7	351	100.0	347	99.7
B (評価合計点の平均が 70 点以上 85 点未満)	1	0.3	0	0.0	1	0.3
C (評価合計点の平均が 60 点以上 70 点未満)	0	0.0	0	0.0	0	0.0
D (評価合計点の平均が 60 点未満)	0	0.0	0	0.0	0	0.0

別ごとの施設数を表5に示した。なお、測定上の問題点や評価点の低い施設の結果に対するコメント等は平成24年度報告書に解説を記しているので参照願いたい。

2) 総合評価

平成16年度より全衛連が実施する労働衛生検査精度管理調査結果は公表することとなり、評価合計点の平均が85点以上の評価区分を「評価A」、70点以上85点未満を「評価B」、60点以上70点未満を「評価C」、60点未満を「評価D」とした。そして、「評価A」は「優」、「評価B、C」は「良」と表示して全

衛連ホームページ等に公表することとなった。

総合評価の各ランクの施設数を表6に示した。

7. 参考調査

本年度、尿中N-メチルホルムアミドについては参考調査として実施した。

調査は、2濃度の試料を測定し、平均値5.3mg/L、標準偏差0.25と平均値20.0mg/L、標準偏差0.54と良好な結果であった。

8. まとめ

第26回をむかえた労働衛生検査の精度管理調査も生体試料測定クロスチェックとその評価を行い終了した。参加施設はここ数年微増していたが、本年度は5施設減少し、今年度の参加申し込み施設は346施設（平成23年度351施設）であった。この346の参加施設の総合評価は、Bランクが1施設あったものの、その他の施設は全てAランクであり、生体試料の分析は精度管理が十分に行なっていると判断する。

ただ、総合評価がAであっても、各項目別にみると、MHAおよびMAにおいてはB評価がそれぞれ1施設、HDではB評価が1施設あり、各項目別評価の低い施設においては、溶液の標準濃度の作成方法、希釈方法、波長測定等の分析条件の確認が必要であると考えられる。

今回もHD用試料には分析時のクロマト解析に影響を与える可能性のある2-アセチルフランが1mg/L添加されていたが、HDの評価点は直接参加施設38施設中36施設が85点以上であった。

成績の公表については、参加全項目の平均による総合評価の成績を点数ではなく、A（100～85点）、B（70～85点未満）、C（60～70点未満）、D（60点未満）で公表することにした。

これは、わずかな点数の違いが、実際には問題とする必要がないにも係らず、精度管理およ

び営業上不必要な悪影響を及ぼしているからである。

なお、各評価の内容は次の如く考えて欲しい。

A：技術的に良好でこの状態を維持する努力をして欲しい。

B：技術的に良好な状態にするため努力をして欲しい。

C：技術的に良好な状態にするため、一層の努力をして欲しい。

D：技術的に不十分であり、早急な対策と努力が必要である。

一方、外部施設に委託している施設は、委託先の成績をその施設の成績としたが、良い結果が得られなかった施設は委託先と十分話し合いをされることが必要と考える。また、引き続いて委託される場合には委託先を充分監視できる体制を整える必要がある。受託施設ではその使命上、全ての項目で90点以上を取ってほしいと考えている。

例年のことであるが本年度の報告においても、記載ミス、計算間違いなどにより成績が悪かった施設が見受けられた。記載ミスなどのヒューマンエラー対策には、作業環境の改善から、業務密度、入力やコードの効率化、自動化、ダブルチェックなどミスの検出体制、作業者の教育訓練に至るまで多方向からの取り組みが必要と考えられる。労働の安全、衛生、保健に従事する者が最初に取り組むべき課題である。

最後に次回も数多くの施設が参加され、優秀な成績を上げられることを期待する。

食品に含まれるヒ素化合物の健康影響

有機ヒ素化合物の体内動態・毒性発現を中心として

山中健三

Kenzo YAMANAKA
日本大学薬学部
環境衛生学研究室教授

圓藤吟史

Ginji ENDO
大阪市立大学大学院
医学研究科産業医学分野教授

1 はじめに

ヒ素の健康影響に関して、鉱山地域周辺環境汚染、中国やバングラデシュなどでの地下水汚染による慢性的な健康被害が世界規模で拡大している。日本では、ヒ素ミルク中毒、和歌山カレー中毒などの事故・事件を通して、ヒ素の毒性に関する理解が一般にも深まった。さて、ヒ素含有量の高い海藻類や魚介類を摂取する食習慣が存在する日本では、諸外国に比べて多くのヒ素化合物を摂取している。海産物にはヒジキ中に多く含まれる無機ヒ素以外は、おおむねアルセノシュガー(AsSugs)、アルセノバタイン(AsBe)といったメチル化された有機ヒ素が多く含まれているが、未同定のヒ素化合物が圧倒的に多く含まれていると思われる。日本国民一人当たりの平均的1日総ヒ素摂取量は、2002~2006年のマーケットバスケット方式による調査から177.8 μg (うち飲料水に由来するヒ素摂取量は約0.1 μg)と推定されており、経口曝露によるヒ素摂取は圧倒的に食品由来、特に海産物由来の有機ヒ素が多いことが明らかになっている。したがって、海産物由来の有機ヒ素化合物の代謝ならびに毒性発現機構を明らかにすることは、ヒトの健康影響を評価するため急務かつ最重要課題となっている。本稿では、食品衛生学の観点から海産物由来のヒ素化合物を取り上げ、代謝・毒性に関するこれまでの知見を中心に紹介する。

2 食品中に含まれるヒ素化合物

海産物の中でヒジキだけは、含有される主要なヒ素化合物が無機ヒ素という特異性があり、最近の健康志向に伴うヒジキの過剰摂取に対し注意喚起され

たことは記憶に新しい。その他の海草類、魚介類に含まれる多くは有機ヒ素であり、無機ヒ素は総ヒ素量の1割以下である。海洋生態系に存在する有機ヒ素化合物の化学形態は多種・多様であり、物理化学的特性から水溶性化合物と脂溶性化合物に大別される。しかしながら、これら有機ヒ素化合物の分析についてはいまだ不十分で、研究情報量も乏しいのが現状である。海洋生態系に存在する主な有機ヒ素化合物を図1に示す。¹⁾

1. 水溶性ヒ素化合物

オーストラリアのレッドロブスターから水溶性トリメチル体のAsBeが単離・同定され、これが魚介類に存在する有機ヒ素化合物の最初の構造決定報告となった。²⁾ この研究を契機として、海藻中の主要なヒ素であるAsSugsの存在も次第に明らかにされてきた。図1(a)の中段および下段に代表的なAsSugsを示すが、dimethylarsinoylribosideまたはtrimethylarsinoylribosideに結合するアグリコンの違いにより、グリセロール型、リン酸型、スルホン酸型、硫酸型などに分類される。その他、海洋動物に含まれる水溶性ヒ素化合物の代表的なヒ素化合物としては、亜ヒ酸(As^{III})、ヒ酸(As^V)をはじめ、酸化トリメチルアルシン(TMAO^V)、アルセノコリン(AsC)、テトラメチルアルソニウム(TMA^s)、さらには無機ヒ素の哺乳動物における主要代謝物であるメタンアルソン酸(MMA^V)やジメチルアルシン酸(DMA^V)なども認められる。

2. 脂溶性ヒ素化合物

これまでに報告されている脂溶性ヒ素化合物はアルセノリピッド(AsLips)で(図1(b))、1988年にワカメから単離・同定されたホスファチジルAsSugsが最初の報告例である。海洋動物に含まれる主要な脂溶性ヒ素はリン脂質が結合したものであり、近年、ジメチルヒ素が結合した脂肪酸型や炭化水素型

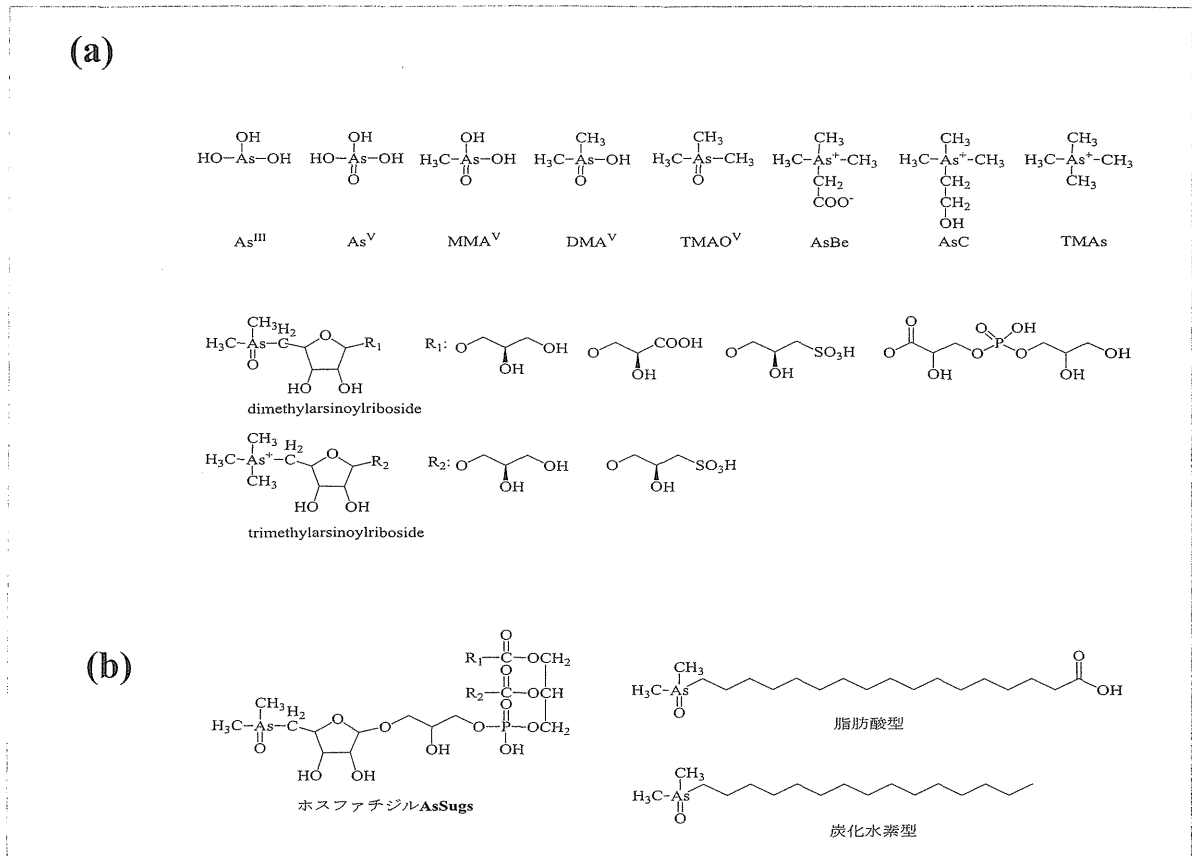


図1 海洋生態系に存在する水溶性(a)および脂溶性(b)ヒ素化合物

のヒ素化合物も同定されている。しかしながら、水溶性ヒ素化合物に比べ微量でかつ単離・分析が困難であることから、研究情報が限られているのが現状である。

3 体内動態

1. 吸収

As^{III}およびAs^Vは、ヒト消化管からの吸収率が60~90%といわれている。特に、飲料水中のAs^{III}およびAs^Vは摂取後、急速かつほぼ完全(90%以上)に吸収されることも示されている。一方、無機ヒ素の主要代謝物であるMMA^V、DMA^Vのヒト消化管からの吸収に関するデータは少ない。MMA^VまたはDMA^Vのいずれかを単回経口摂取(500 μ g As)したヒトを対象にした実験報告では、それぞれ摂取用量の78%および75%が摂取4日後までに尿中排泄された。一方、合成されたAsSugsを単回経

口摂取した男性ボランティアでも、4日後までにヒ素として約80%が尿中に排泄されたことから、ヒトにおいて海産物中に存在する代表的な水溶性ヒ素化合物のAsSugsはほぼ完全に消化管から吸収されるものと推察されている。しかし最近、食品に含まれる食物繊維などのマトリックスの存在はAsSugsの吸収に大きく影響し個人差が大きいこと、さらに、食品の調理方法や咀嚼の程度なども大きく影響することが示されている。

2. 分布

As^{III}は生理学的なpHでは不溶態であり、イオン化態であるAs^Vより迅速に肝細胞に取り込まれ、さらにAs^{III}はAs^Vより10倍ほどチオール基との親和性が高いことが古くから知られている。その後、肝臓に取り込まれた無機ヒ素は効率よくメチル化され、他の器官に再分布するか、あるいは還元型グルタチオン(GSH)と抱合体を形成して胆汁中に排泄されるという。³⁾ ヒトの血漿中からは、As^{III}、As^V、

MMA^{III}, MMA^V, DMA^{III}, DMA^V, AsBe, AsC (図1および2)などが検出されるが、それらは日本人の場合、主に海産物摂取により取り込まれたヒ素化合物ならびにその代謝物に起因するものと思われる。

ヒ素化合物は、胎盤を通過し容易に胎児移行する。一方、母乳に移行されるヒ素濃度は低いことも報告されている。

3. 代謝

図2(a)に、哺乳動物における無機ヒ素の代謝経路を示す。ヒ素の3価から5価への酸化に伴い、メチル基が導入される酸化メチルヒ素の代謝機構として一般的に提唱されているが、主にDMA^Vとして尿中に排泄される。メチル化機序はヒ素のレドックスサイクルの中でS-アデノシル-L-メチオニン(SAM)がメチル供与体となり、3価ヒ素メチル転移酵素(AS3MT)によるものと考えられている。MMA^VおよびDMA^VはAs^{III}およびAs^Vに比べ急性毒性が低いことから、このメチル化代謝は生体における無機ヒ素の解毒機構の1つと考えられてきた。しかしながら近年、DMA^Vは動物実験から発がん性を示す結果も報告され、メチル化代謝機構が発がん

への代謝的活性化機構であることも疑われてきた。

AsSugsを摂取したヒト尿中代謝物として、主代謝物のDMA^Vのほかジメチルチオアルシン酸(DMTA^V)、ジメチルアルセノエタノール(DMAE)およびAsSugsの含硫代謝物などが検出されている。このように、AsSugsの主要代謝物はDMA^Vやその類縁化合物(ジメチルヒ素)であることから、それぞれ個別のヒ素化合物の詳細な代謝経路の解明ならびに発がん性を中心とした毒性評価が必要と思われる。一方、海産物の中に含有される水溶性ヒ素化合物のうちで最も主要なAsBeは消化管から迅速に吸収され、ヒトの場合には72時間以内に未変化体として尿中に排泄された。したがって、AsBeは無機ヒ素とは異なり代謝されず迅速に尿中排泄されるため、極めて毒性は低いものと考えられている。

4. 排泄

多くの哺乳動物でのヒ素およびその代謝物は、主として尿を排泄経路としている。我々の研究グループでは、ヒジキ加工食品を摂取した男性ボランティアの尿中に排泄されたヒ素を経時的に化学形態別に分析した結果、As^V, As^{III}, MMA^V, DMA^Vはヒジ

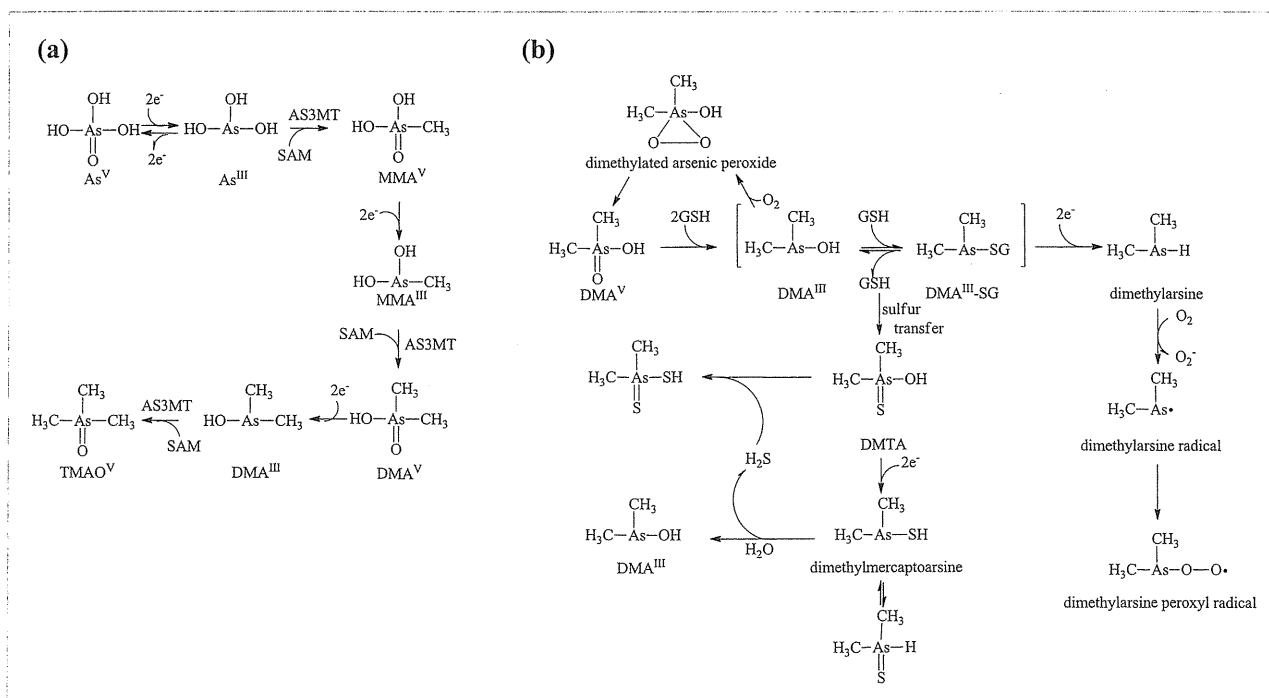


図2 無機ヒ素のメチル化代謝機構(a)ならびにジメチルヒ素の代謝活性化機構(b)

キ摂取後それぞれ4, 6.5, 13, 17.5時間でピーク濃度に達すること⁴⁾を報告した。

また、ヒジキ摂取後48~50時間で50~90%のヒ素が排泄された。日本人ボランティア210名に対し行った調査結果では、尿中におけるAsBeの中央値が61.3 $\mu\text{g As/L}$ 、DMA^Vの中央値が42.6 $\mu\text{g As/L}$ と高い値が報告されている。⁵⁾ 一般にAsBeは、その大部分が代謝されず摂取後速やかに尿中排泄されるが、AsSugsは実験動物に対して発がん性を有するDMA^V、あるいはその類縁のDMAEなどに代謝変換されることから、AsSugsなどの海産物由来の水溶性有機ヒ素、さらにはジメチルヒ素の骨格を有する脂溶性ヒ素の代謝排泄に関する知見を得るため、更なる検討が必要である。

4 毒性

1. 発がん性

慢性ヒ素中毒はアジア、中南米諸国、北米などで発生している無機ヒ素に汚染された飲料水の長期経口摂取による事例が大部分である。慢性ヒ素中毒の発症までの時間は曝露量に依存的であり、飲料水中のヒ素濃度が100 $\mu\text{g As/L}$ を超えると中毒症状が顕著に増大する可能性があるという。

国際がん研究機関(IARC)は、2011年にヒ素曝露による発がん性の再評価結果を公表した。⁶⁾ 飲料水中の無機ヒ素が膀胱がん、肺がん、皮膚がんを誘因することに十分な疫学的証拠があり、いずれのがんも用量依存性が示されていることから、グループ1(ヒトに対する発がん性が認められる)に分類された。根拠となった疫学データの多くは、無機ヒ素ならびにその化合物により汚染された井戸水による影響から検討されたものであり、高濃度曝露での発がん性は多くの研究で一致した見解であるものの、低濃度曝露での影響濃度を導き出すには至っていないのが現状である。一方、無機ヒ素と肝臓、腎臓、前立腺、その他の組織のがんと関連も一部の研究では示唆されているものの、バイアスがかかっている可能性も排除できないことから、限定的なコホート研究の知見しか得られていない。

食品に関しては、日本において調理ヒジキからの

ヒ素摂取量の推定から発がんリスクが許容リスクを上回ることが示されているが、実際に食品で発がん性を明らかにしたコホート研究や症例対照研究は報告されていない。

2. 遺伝毒性

無機ヒ素は細胞毒性が高く、染色体異常も誘発することが知られている。一方、図2(a)に示したメチル化代謝過程の中でMMA^VからDMA^Vへの還元過程で生成するMMA^{III}、およびDMA^Vの還元代謝過程で生ずるDMA^{III}も細胞毒性または遺伝毒性を誘発することが報告されており、その一因としては図2(b)に示すように、活性酸素や過酸化ジメチルヒ素の生成を介した酸化ストレスによるものと推定されている。他方では、DMA還元代謝物であるDMA^{III}-SG複合体を含めたDMA^{III}の酵素的な二電子還元代謝過程で生成するジメチルアルシンと分子状酸素との反応によるジメチルアルシンラジカルやその過酸化ラジカルの細胞障害性フリーラジカルの生成⁷⁻⁹⁾ならびにジメチルヒ素と生体内含硫化合物との反応により、細胞毒性や遺伝毒性の高いDMTA^Vなど、含硫メチルヒ素化合物の生成¹⁰⁾が報告されている。DMA^Vの経口投与により、膀胱がんや肺がんなどが誘発されることが動物実験から明らかにされているが、近年では、ヒ素発がんはこれらの活性代謝物が関与すると考えられるようになり、より一層の解明が期待されている。このような研究結果から、2011年IARCは、有機ヒ素に関する発がん性の再評価を行い、DMA^VやMMA^Vをグループ2B(ヒトにがんを起こす可能性がある)に分類した。⁶⁾

3. その他の毒性

皮膚がんへの進行前の特徴的な病変として知られる、皮膚色素沈着、白斑および掌蹠角化症などは慢性無機ヒ素中毒の高感度指標であり、これらの皮膚への影響はヒ素汚染飲料水を介した反復経口曝露を含むヒトの調査の大多数で指摘されている。さらに、無機ヒ素による汚染飲料水摂取から自然流産、死産早産のリスクや出生時体重の低下などの生殖毒性に関する報告や神経発達障害に関する報告もあるが、確定的な証拠は得られていない。

4. 海産物に特有な有機ヒ素の毒性

有機ヒ素化合物には様々な種類があり、それぞれの化合物の毒性は同等でないため、化合物ごとに分けて毒性を考える必要がある。AsBeはマウスへ10 mg/kg以上経口投与した場合でも、毒性は見られないとの報告がある。吸収されたAsBeは代謝を受けず速やかに尿中排泄されるという事実からも、AsBeの毒性は無視できるものと考えられている。AsSugsならびにAsLipsはヒトの体内で最終的にDMA^VやTMAO^Vにまで代謝変換されるが、毒性に関するデータは極めて少ない。水溶性ヒ素化合物の代表であるグリセロール型AsSugsに関する動物試験データも報告されていない。これは評価に必要とされる大量の精製品を得ることが困難であることに基因する。一方、*in vitro* 実験による細胞増殖阻害や染色体異常誘発に関して、AsSugsは無機ヒ素に比べて極めて低い活性しかないことが示されている。

マウス経口投与でのLD₅₀値はAsC 6.5 g/kg, TMAO^V 10.6 g/kg, TMA^S 0.90 g/kg, AsBe >10 g/kg, DMA^V 1.2 g/kg, MMA^V 1.8 g/kgとの報告がある。一方で無機ヒ素であるAs^{III}は34.5 mg/kgであり、これら有機ヒ素の急性毒性は極めて低いことは明らかである。

水溶性ヒ素化合物と比較して情報量が少ない脂溶性ヒ素については、近年、タラ肝油を摂取したヒト尿からDMA^Vならびにジメチルヒ素を含有する脂肪酸型の有機ヒ素が検出された。最近、ホスファチジルAsCを経口投与したマウス代謝実験から、その大部分が消化管から吸収され、ホスホリパーゼDによりAsCが遊離、最終的にはAsBeへ代謝変換され、その大部分は尿中排泄されることが報告された。

これまでの結果から、AsSugsやAsLipsの急性毒性は通常の日常食品の摂取からは無視できるものと予想されるが、慢性毒性、特に発がん性に関しては、それら代謝物の多くがDMA^Vとの報告もあることから、代謝経路を明らかにするとともにそれら

代謝物の発がんリスクに関する評価データの蓄積が切望される。

5 まとめ

ヒ素化合物の発がん性の分類に関して、IARCは2011年にAs^{III}, As^Vの無機ヒ素化合物をグループ1, その生体内代謝物であるMMA^V, DMA^Vをグループ2B, 海産物由来のAsBeおよびヒト体内で代謝されない化合物をグループ3(ヒトに対する発がん性が分類できない)に分類し、ヒ素の発がんリスクに関しては無機ヒ素からその代謝物も含めて化学形態別に評価する必要があると指摘している。⁶⁾

海産物由来のヒ素化合物に関して、未知の化学構造を有する有機ヒ素化合物が多数存在すると推定されている。したがって、有機ヒ素の形態別分析法の確立が強く望まれている。一方で、海産動植物に含まれるヒ素化合物のうち、発がん性が疑われているジメチルヒ素の骨格を有するヒ素化合物、特にAsSugsやAsLipsについて、体内動態の把握や毒性評価の実施などが急務な研究課題である。さらにAsLipsは、その脂溶性から生体に取り込まれた場合、生物学的半減期が長いことも予想され、毒性の観点からはより詳細な検討が不可欠であろう。今後の研究の進展を願っている。

参考文献

- 1) 花岡研一, “レアメタル便覧(Ⅲ),” 丸善, 東京, 2011, p. 589.
- 2) Edmonds J. S. *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 18, 1543-1546 (1977).
- 3) Suzuki K. T. *et al.*, *Talanta*, 58, 111-119 (2002).
- 4) Nakajima Y. *et al.*, *Appl. Organomet. Chem.*, 20, 557-564 (2006).
- 5) Hata A. *et al.*, *J. Occup. Health.*, 49, 217-223 (2007).
- 6) International Agency for Research on Cancer (IARC), “IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 100,” A Review of Human Carcinogens, Part C: Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts, 2011, pp. 41-93.
- 7) Yamanaka K. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168, 58-64 (1990).
- 8) Kitchin K. T., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 172, 249-261 (2001).
- 9) Yamanaka K. *et al.*, *Life Sci.*, 84, 627-633 (2009).
- 10) Yoshida K. *et al.*, *Chem. Res. Toxicol.*, 16, 1124-1129 (2003).

労働衛生検査精度向上研究会活動報告

微量金属の施設間クロスチェック

労働衛生検査精度向上研究会
佐賀大学医学部 市場正良 山本 忍
(株)江東微生物研究所 天野有康 中村 正

1. はじめに

労働衛生検査精度向上研究会は、労働衛生検査を多数受託している検査施設が自主的に組織した研究会である。定期的に施設間差是正および精度の向上のためにクロスチェックや研修会を開催している。今回、微量金属クロスチェックとして平成22年度、23年度に実施した鉛、カドミウムおよびその他の金属の結果を報告する。

今回実施した微量金属は、鉛、カドミウム、水銀、クロム、マンガン、ヒ素、ニッケル、セレンである。特殊健康診断として、鉛中毒予防規則に基づき、血中鉛の測定が実施されており、平成22年の全国の実診者数は69,617名であった¹⁾。研究会会員施設では、平成23年度は89,149件の検査実績があった。血中鉛濃度の生物学的許容値は、日本産業衛生学会から $40\mu\text{g}/100\text{ml}$ ²⁾、米国ACGIHから $30\mu\text{g}/100\text{ml}$ が提案されている³⁾。また、小児では、 $10\mu\text{g}/100\text{ml}$ ともいわれる。

鉛以外の金属は、特定化学物質障害予防規則に基づく特殊健康診断で行われる検査項目であ

る。平成22年の受診者数は、カドミウム3,404名、水銀4,725名、クロム24,310名、マンガン26,061名、ヒ素12,435名、ニッケル32,096名であった¹⁾。検査項目としては、カドミウムが二次健診で尿中カドミウム測定、水銀は二次健診で尿中水銀測定、マンガンは二次健診で尿中または血中マンガン測定、ニッケルは二次健診で尿中ニッケル測定、ヒ素は二次検査で尿中ヒ素化合物（砒酸、亜砒酸、メチルアルソン酸）測定が行われている。厚生労働省による特殊健診見直し案ではカドミウム健診で、一次健診で血中カドミウム測定が提案されている⁴⁾。生物学的許容値は、日本産業衛生学会から尿中水銀濃度 $35\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{Cr}$ が、ACGIHからは、カドミウムは尿中 $5\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{Cr}$ 、血液 $5\mu\text{g}/\text{L}$ 、クロム(VI)は $25\mu\text{g}/\text{L}$ 、無機ヒ素及びメチル化代謝物として $35\mu\text{gAs}/\text{L}$ （作業終了時）が提案されている²⁾。これらの金属は、環境汚染の曝露指標として測定される場合もある。

2. 方法

1) 試料

試料は市販の精度管理用コントロール血、尿を使用した。凍結乾燥品であり、測定前に蒸留水を規定量加え、完全に溶解し測定に供した。

平成22年度は、尿は①NIST SRM 2670 Normal Level, ②SRM 2670 Elevated Level, ③Serorm Trace Element Urine, 血液は④Serorm Trace Element Whole Blood L-1, ⑤Blood L-3を使用した。試料配布は平成23年1月、データを2月に回収した。

平成23年度は、尿は①BIO-RAD Lyphochek Urine metal control 1, ②control 2, 血液は③BIO-RAD Lyphochek Whole blood metal control 1, ④control2を使用した。③, ④には違うロットを含んでいる。試料配布は平成24年3月に実施した。

2) 分析方法

22年, 23年で各金属の分析方法に変更はなかった。鉛分析は各施設フレームレス原子吸光法であり、血液の希釈は、5から11倍であった。希釈液にはトリトン, リン酸水素2アンモンを使用している。希釈および注入量から計算したキュベット内の血液絶対量は、0.5から4 μ lであった。原子化温度は2100~2800 $^{\circ}$ Cであった。尿の測定ではパラジウムを添加し、原子化温度は1800~2800 $^{\circ}$ Cであった(表1)。

カドミウム測定は、各施設フレームレス原子吸光法であり、血液の希釈は、4から11倍であり、希釈液にはトリトン, リン酸水素2アンモニウムを使用している。希釈および注入量から計算したキュベット内の血液絶対量は、0.9から4 μ lであった。原子化温度は1600~

2200 $^{\circ}$ Cであった。尿の測定ではパラジウムを添加し、原子化温度は1500~2200 $^{\circ}$ Cであった。

3. 結果と考察

鉛, カドミウムの試料のメーカー参考値と測定結果を表2に示す。鉛は、22年実施の試料①を除き、CVは10%程度であった。低濃度試料は参考値とのずれが大きい。23年の血液③は、各施設の平均値が参考値の許容範囲を越えていた。A施設は2年とも、高めの値を示し、G施設は低めの値を示している。22年のF施設は再測定を行なった結果である。カドミウムは、22年の試料①, ④を除き、CVは7から16%であった。D施設は低めの値を示した。C施設は22年の④ではずれ値を示した。測定値のずれを説明できる測定方法の影響は不明である(表2)。

過去の結果との比較では、平成19年報告の血液, 尿の曝露検体各2本計4本のカドミウムクロスチェック結果では、CVは1検体を除き、10%前後であった⁵⁾。平成22年実施の血中鉛では、CVは12%であり⁶⁾、今回とほぼ同様であり、金属類のCVは10%程度と言えるか。一方、全衛連の精度管理調査結果では、Pb-BのCVは3%前後である⁷⁾。全衛連のクロスチェックは、通常とは違う細心の注意のもとで行われていると思われ、かなり収束するはずであろう。よって10%程度のCVが通常の検査の状態を表すといえるかが、逆にこれを改善させる余地は残っているとも言える。

水銀, クロム, マンガンの結果は一部の検体を除き良好であった。ヒ素, ニッケル, セレンは参加施設が1社だけであったので、結果は省略する(表3)。

表 1 血中鉛分析方法

機関名	A			B			C			D			E		
測定法	原子吸光法 (フレイムレス)			原子吸光法 (フレイムレス)			原子吸光法 (フレイムレス)			原子吸光法 (フレイムレス)			原子吸光法 (フレイムレス)		
試料	ヘパリン加血液			血液(EDTA-2K)			ヘパリン加血液			ヘパリン加血液			ヘパリン加血液		
報告下限値	0.5 µg/dl 以下			0.1 µg/dl 以下			1.0 µg/dl 以下			1.0 µg/dl 以下			1.1 µg/dl		
前処理試料 / 前処理溶液量	100 µl/950 µl			100 µl/400 µl			100 µl/900 µl			100 µl/1000 µl			250 µl/2250 µl		
前処理溶液	0.5% トリトン X100			1% トリトン X100 + 2% リン酸水素 2 アンモニウム			1% トリトン X100 + 1% リン酸二水素アンモニウム			0.5% トリトン X100			2% リン酸水素 2 アンモニウム + 0.5% トリトン		
修飾剤添加方法 (炉内・炉外)	炉外			-			炉外			炉外			炉外		
修飾剤名称・濃度	5% リン酸水素 2 アンモニウム			-			-			1% リン酸水素 2 アンモニウム			-		
試料注入量	10 µl			20 µl			10 µl			10 µl			10 µl		
修飾剤添加量	-			-			-			-			-		
その他添加物、添加量	-			-			-			-			精製水 10 µL		
測定回数 / 1 試料	3			2			1			2			1		
測定機器	Z2010			Analyst-600			Z5010			Z2710			SpectrAA880・220		
メーカー	日立			パーキン			日立			日立			パリアン		
測定波長	283.3nm			283.3nm			283.3nm			283.3nm			283.3nm		
キャリアーガス	Ar			Ar			Ar			Ar			Ar		
シースガス	Ar			Ar			Ar			Ar			Ar		
温度プログラム	TEMP (°C)	TIME (sec)	ガス流量 (ml/min)	TEMP (°C)	TIME (sec)	ガス流量 (ml/min)	TEMP (°C)	TIME (sec)	ガス流量 (ml/min)	TEMP (°C)	TIME (sec)	ガス流量 (ml/min)	TEMP (°C)	TIME (sec)	ガス流量 (ml/min)
	50-120	40	200	110	25	250	70-85	45	200	50-60	30	200	85	5	3000
	120-650	10	200	110-130	5	250	85-100	15	200	59-68	35	200	95	60	3000
	650	50	200	130	25	250	100-110	5	200	120-550	30	200	120	15	3000
	2200	5	30	550	50	250	110-750	10	200	550	20	200	600	10	3000
	2500	10	200	1600	3	50	750	25	200	2000	5	0	600	5	3000
				2400	3	250	750	5	10	2400	5	200	600	2	0
							2400	4	10				2400	1	0
							2800	8	200				2400	1	0
													2500	1	3000
BG 補正法	ゼーマン (直流)			偏向ゼーマン			ゼーマン (直流)			偏向ゼーマン			ゼーマン交流		
キュベット (チューブ) 種類・形状	グラファイト (バイロ化チューブ)			バイログラファイト (十字型)			バイログラファイト (A 型チューブ)			グラファイト (バイロ化チューブ)			グラファイトコンポーネントチューブ プラットフォーム		
光源	HCL			HCL			HCL			HCL			HCL		
信号読取	汎用パソコン			専用パソコン			汎用パソコン			汎用パソコン			専用パソコン		
計算	ピークハイト			ピークエリア			ピークハイト			ピークハイト			ピークハイト		
検量線	簡易標準添加, 直線回帰			簡易標準添加, 直線回帰			簡易標準添加, 直線回帰			簡易標準添加, 直線回帰			簡易標準添加, 直線回帰		
検量線ポイント	0・10・20・30・40 µg/dl			0・10・20・30 µg/dL			19.6・39.2・58.8 µg/dl			10.20.30.40 µg/dL			0・10・20・40 µg/dL		

機関名	F			G			H			I		
測定法	原子吸光法 (フレイムレス)			原子吸光法 (フレイムレス)			原子吸光法 (フレイムレス)			原子吸光法 (フレイムレス)		
試料	ヘパリン加血液			ヘパリン加血液			ヘパリン加血液			ヘパリン加血液		
報告下限値	5 µg/dL 以下			1.0 µg/dl 以下			1.0 µg/dl 以下			0.2 µg/dl 以下		
前処理試料 / 前処理溶液量	40 µL/360 µL			100 µl/500 µl			100 µl/900 µl			100 µl/900 µl		
前処理溶液	1% リン酸水素 2 アンモニウム + 0.5% トリトン			1.25% リン酸 2 水素アンモニウム + 1% トリトン X100			0.2% トリトン X100			1% トリトン X100		
修飾剤添加方法 (炉内・炉外)	炉外			炉外			炉内			炉内		
修飾剤名称・濃度	-			-			0.7% リン酸水素 2 アンモニウム			1% リン酸 2 水素アンモニウム		
試料注入量	10 µL			10 µl			10 µl			5 µl		
修飾剤添加量	-			-			6 µl			5 µl		
その他添加物、添加量	精製水 10 µl			-			-			-		
測定回数 / 1 試料	2			1			1			1		
測定機器	SpectrAA240Z			SpectrAA240Z			SIMAA6000			SpectrAA220Z		
メーカー	パリアン			パリアン			パーキンエルマー			パリアン		
測定波長	283.3nm			283.3nm			283.3nm			283.3nm		
キャリアーガス	Ar			Ar			Ar			Ar		
シースガス	Ar			Ar			Ar			Ar		
温度プログラム	TEMP (°C)	TIME (sec)	ガス流量 (ml/min)	TEMP (°C)	TIME (sec)	ガス流量 (ml/min)	TEMP (°C)	TIME (sec)	ガス流量 (ml/min)	TEMP (°C)	TIME (sec)	ガス流量 (ml/min)
	85	15	300	85	5	300	120	25	250	80	5	3000
	95	40	300	95	30	300	121-150	35	250	95	30	3000
	120	10	300	120	10	300	179-700	20	250	120	10	3000
	600	8	300	600	15	300	2300	4	OFF	600	25	3000
	600	5	300	600	10	300	2500	5	250	600	2	0
	600	3	0	600	2	0				2100	3	0
	2100	2	0	2300	1	0				2600	3	3000
	2100	2	0	2300	2	0						
	2300	1	300	2600	2	300						
BG 補正法	ゼーマン交流			ゼーマン交流			ゼーマン交流			ゼーマン交流		
キュベット (チューブ) 種類・形状	バイログラファイト			バイログラファイト			グラファイト (バイロコート) 十字プラットフォーム			バイログラファイト		
光源	HCL			HCL			HCL			HCL		
信号読取	専用パソコン			専用パソコン			専用パソコン			専用パソコン		
計算	ピークハイト			ピークハイト			ピークエリア			ピークハイト		
検量線	簡易標準添加			簡易標準添加			簡易標準添加, 直線回帰			簡易標準添加		
検量線ポイント	15・25・35 µg/dl			0・15・30 µg/dl			30.60 µg/dl			0・10・20 µg/dl		

表2 鉛, カドミウムクロスチェック結果

鉛

機関名	22年度					23年度					
	尿 (μg/L)			全血 (μg/dL)		尿 (μg/L)		全血 (μg/dL)			
	①	②	③	④	⑤	①	②	③		④	
参考値	10	109	40.3	1.48	50.3	13.2 (8.70- 17.7)	66.9 (53.5- 80.2)	8.03 (6.18- 9.88)	10.9 (8.73- 13.1)	26.2 (21.0- 31.4)	28.8 (23.0- 34.5)
A				1.79	51.3			12.4		35.3	
B				1.15	49.5			10.3		29.3	
C	5.30	109.2	41.3	1.50	52.8	11.3	78.7	11.0		31.5	
D	8.73	103.9	29.6	1.70	64.5	12.5	61.2		8.8		26.1
E	5.30	110.8	41.1	1.50	50.0						
F				1.48	50.3	11.0	69.3	10.3		29.8	
G	5.39	98.2	38.1	1.5	48.8	9.6	53.9	9.50		27.7	
H				1.50	48.3			10.4		31.4	
I	5.50	98.5	40.5	1.42	47.4	12.5	66.5	9.04			27.7
n	6	6	6	9	9	5	5	7	1	6	2
mean	6.04	104.1	38.1	1.50	51.4	11.4	65.9	10.4		30.8	
SD	1.50	5.9	4.95	0.178	5.15	1.21	9.25	1.08		2.61	
CV (%)	24.9	5.6	13.0	11.8	10.0	10.6	14.0	10.4		8.5	

カドミウム

機関名	22年度					23年度					
	尿 (μg/L)			全血 (μg/dL)		尿 (μg/L)		全血 (μg/dL)			
	①	②	③	④	⑤	①	②	③		④	
参考値	0.4	88	4.6	0.067	1.08	9.19 (7.36- 11.0)	16.0 (12.8- 19.2)	.513 (.411- .616)	1.16 (.926- 1.39)	1.28 (1.02- 1.54)	2.10 (1.68- 2.52)
A											
B	0.96	89.6	4.68	0.07	1.08	9.20	16.1	0.5		1.4	
C	0.58	86.0	5.68	0.28	1.25	10.3	18.3	0.6		1.8	
D	0.36	84.1	3.46	0.04	0.86	6.0	12.3		0.4		1.8
E											
F	0.76	89.9	4.20	0.01	0.85	8.7	16.1	0.5		1.4	
G	0.89	90.2	5.16	0.05	1.10	10.0	17.6	0.50		1.4	
H	0.60	99.3	5.00	0.04	0.91	9.20	15.3	0.5			2.0
I	0.50	91.8	4.20	0.06	1.05	9.2	17.1	0.55			2.4
n	7	7	7	7	7	7	7	6	1	4	3
mean	0.66	90.1	4.63	0.078	1.01	8.9	16.1	0.5		1.5	2.1
SD	0.215	4.85	0.737	0.091	0.147	1.41	1.96	0.04		0.20	0.28
CV (%)	32.4	5.4	15.9	116.3	14.5	15.7	12.2	7.5		13.2	13.4

表3 水銀, クロム, マンガン クロスチェック結果

機関名	水銀 (Hg) (μg/L)				クロム (Cr) (μg/L)						マンガン (Mn) (μg/L)			
	22年度		23年度		22年度			23年度			22年度		23年度	
	②	③	①	②	①	②	③	①	②	①	②	③	①	②
表示値	105.0	40.7	31.4 (20.7- 42.1)	106 (63.8- 149)	13.0	85.0	19.7	1.60 (.768- 2.43)	21.4 (.17.2- 25.7)	30.0	330.0	12.3	8.47 (6.77- 10.2)	32.8 (26.3- 39.4)
A														
B	72.4	35.0	28.6	103.5	10.8	87.9	19.8	1.0	20.7	26.2	343.0	12.2	7.7	26.3
C			18.0	99										
D														
E														
F														
G		41.4	39	110	10.9	72.1	20.0	2.1	22.6	28.71	384.0	18.81	7.6	29.6
H	78.9	45.1	25	93	10.8	86.3	19.9	3.9	26.1	27.2	326	12.4	7.0	29.9
I					12.4	89.9	24.4							
n	2	3	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3
mean	75.7	40.5	27.7	101	11.228	84.0	21.0	2.3	23	27.4	351.0	14.5	7.4	29
SD	4.60	5.11	8.75	7.18	0.783	8.11	2.26	1.46	2.74	1.26	29.8	3.76	0.38	2.00
CV (%)	6.1	12.6	31.7	7.1	7.0	9.7	10.8	62.7	11.8	4.6	8.5	26.0	5.1	7.0

今回から、試料の準備作業を簡略化するため、従来は曝露検体をプールしていたが、今回は市販のコントロール試料を利用した。凍結乾燥品であり各施設での融解時の誤差も考慮しなければいけない。また、今回平均値と参考値のずれがあった検体もあり、参考値の信頼性には疑問がないわけではない。準備の簡便さから今後もしばらく使用を続ける。また、特殊健診の見直しでコバルトの測定も考慮されており、今回はコバルト測定も組み込む予定である。

参考文献

- 1) 労働衛生のしおり 平成23年度 中央労働災害防止協会
 - 2) 許容濃度等の勧告, 日本産業衛生学会
 - 3) TLVs and BEIs, ACGIH, 2011
 - 4) 「労働安全衛生法における特殊健康診断等に関する検討会」中間報告書 平成23年9月
<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000001q0jl.html>
 - 5) 血液中及び尿中カドミウムの施設間クロスチェック, 奈良部 安, 津田聡一郎 労働衛生管理 18, 43-44, 2007
 - 6) 血中鉛および尿中 δ -アミノレブリン酸のクロスチェック結果報告について, 杉山, 浩貴, 関顯 労働衛生管理 22 (2), 24-29, 2011
 - 7) 平成23年度労働衛生検査精度管理調査 平成24年3月 全国労働衛生団体連合会
- ※ 労働衛生検査精度向上研究会会員：佐賀大学医学部 市場正良, (公財)神奈川県予防医学協会 石渡 和男, (株)近畿エコサイエンス 廣瀬隆穂, 中央労働災害防止協会・労働衛生調査分析センター 山内 恒幸, 関西労災病院・産業中毒研究センター 圓藤 陽子, パナソニック産業衛生科学センター 城山 康, (株)エスアールエル 森 浩司, 金村 茂, 濱野和可子, (株)江東微生物研究所 天野 有康, 中村正, (株)ビー・エム・エル 木戸誠二郎, (株)保健科学研究所 関 顯, 杉山 浩貴, 三菱化学メディエンス(株) 竹嶋 淳, 錦織 千賀, 全衛連事務局 國吉 克正

Development of an Analytical Method for the Determination of Arsenic in Urine by Gas Chromatography-mass Spectrometry for Biological Monitoring of Exposure to Inorganic Arsenic

Akito TAKEUCHI¹, Akira NAMERA², Yaeko KAWASUMI³, Tsutoshi IMANAKA⁴,
Norihiro SAKUR⁵, Hirokazu OTA¹, Yoko ENDO⁶, Kimiaki SUMINO¹ and Ginji ENDO⁷

¹Osaka Occupational Health Service Center, Japan Industrial Safety and Health Association, Japan, ²Department of Forensic Medicine, Institute of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University, Japan, ³Occupational Health Research and Development Center, Japan Industrial Safety and Health Association, Japan, ⁴Fukushima Factory, GL Sciences Inc., Japan, ⁵Agilent Technologies, Japan, ⁶Research Center for Occupational Poisoning, Kansai Rosai Hospital, Japan Labour Health and Welfare Organization, Japan and ⁷Department of Preventive Medicine and Environmental Health, Graduate School of Medicine, Osaka City University, Japan

Abstract: Development of an Analytical Method for the Determination of Arsenic in Urine by Gas Chromatography-mass Spectrometry for Biological Monitoring of Exposure to Inorganic Arsenic: Akito TAKEUCHI, et al. Osaka Occupational Health Service Center, Japan Industrial Safety and Health Association—Objectives: The purpose of this study was to develop an analytical method for the simultaneous determination of inorganic arsenic [As(III) and As(V)] and monomethylarsonic acid (MMA) in urine by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for the biological monitoring of exposure to inorganic arsenic. **Methods:** Arsenic compounds (after reduction of arsenic to the trivalent state) were derivatized with 2,3-dimercapto-1-propanol and then analyzed using a GC-MS. The proposed method was validated according to the US Food and Drug Administration guidelines. The accuracy of the proposed method was confirmed by analyzing Standard Reference Material (SRM) 2669 (National Institute of Standards and Technology). **Results:** Calibration curves showed linearity in the range 1–100 µg/l for each of the arsenic species, with correlation coefficients of >0.999. For each of the arsenic species, the limits of detection and quantification were 0.2 µg/l and 1 µg/l, respectively. The recoveries were 96–100%, 99–102% and 99–112% for As(III), As(V) and MMA, respectively. Intraday accuracy and precision were 82.7–99.8% and 0.9–7.4%, respectively.

Interday accuracy and precision were 81.3–100.0% and 0.8–9.9%, respectively. The analytical values of SRM 2669 obtained by the proposed method were sufficiently accurate. **Conclusions:** The proposed method overcame the disadvantages of high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry. It was a robust, selective and cost-effective method suitable for routine analyses and could be useful for the biological monitoring of occupational exposure to inorganic arsenic.

(J Occup Health 2012; 54: 434–440)

Key words: 2,3-Dimercapto-1-propanol, Arsenate, Arsenite, Gas chromatography-mass spectrometry, Monomethylarsonic acid, Urine

Arsenic is widely distributed in the environment. Pollution due to arsenic worldwide has become a serious problem and has caused various adverse effects on human health¹. Significant occupational exposure to arsenic exists in several industries, such as non-ferrous smelting, electronics and wood preservation¹. Such exposure is mainly in the form of inorganic arsenic (iAs), including arsenite [As(III)] and arsenate [As(V)]^{2,3}. Arsenic and inorganic arsenic compounds have been classified as Group 1 (carcinogenic to humans) compounds by the International Agency for Research on Cancer (IARC) because they cause cancers of the skin, bladder and lungs, and there is limited evidence that they may also cause cancers of the kidney, liver and prostate⁴.

iAs is methylated to monomethylarsonic acid (MMA) and dimethylarsinic acid (DMA) in the human body^{1–4}. The American Conference of Governmental

Received May 10, 2012; Accepted Aug 28, 2012

Published online in J-STAGE Oct 4, 2012

Correspondence to: A. Takeuchi, Osaka Occupational Health Service Center, Japan Industrial Safety and Health Association, 2–3–8 Tosabori, Nishi-ku, Osaka 550-0001, Japan
(e-mail: a-takeuchi@jisha.or.jp)

and Industrial Hygienists (ACGIH)² and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)³ recommend the sum of iAs, MMA and DMA concentrations as the biological exposure value for iAs exposure. However, large amounts of DMA and arsenobetaine (AsBe) and small amounts of MMA and iAs have been observed in the urine of Japanese individuals who habitually ingest seafood without occupational exposure to iAs because seafood (including seaweeds) contains high levels of organoarsenic compounds, such as DMA, AsBe, arsenosugars and arsenocholine⁵. Recently, Hata *et al.* reported that the sum of iAs and MMA concentrations in urine was more suitable than that of iAs, MMA and DMA concentrations in urine for the biological monitoring of occupational iAs exposure of workers who habitually consume seafood⁵. The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan also defined the sum of iAs and MMA concentrations in urine as the iAs exposure indicator⁶. Therefore, a rapid and simple analysis for only iAs and MMA is more effective than speciation analysis for the biological monitoring of occupational exposure to iAs.

Currently, high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) is the mainstay of speciation analyses of arsenic in biological samples because of its sensitivity and effectiveness^{5,7}. However, it is a remarkably expensive and complicated system, and hence it is not commonly used in many laboratories. Moreover, its operation requires skilled techniques and high running costs.

The aim of the present study was to develop and validate a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method for the simultaneous determination of iAs and MMA in urine. To obtain the sensitivity required for biological monitoring, we modified the previous GC-flame photometric detection method using 2,3-dimercapto-1-propanol (also known as British Anti-Lewisite: BAL) as the derivatizing reagent⁸. We used GC-MS equipped with a capillary column, because it has a high capability of separation, high sensitivity and high efficiency for confirmatory identification of compounds. Another required modification was optimization of the procedure for sample preparation, including optimization of reaction conditions, scale-down of the sample volume and change of extraction solvent. The proposed method overcame the disadvantages of HPLC-ICP-MS. It was a robust, selective and cost-effective method suitable for routine analyses.

Materials and Methods

Materials

Sodium metaarsenite was purchased from Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA). Disodium hydro-

genarsenate heptahydrate and BAL were obtained from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Methylarsonic acid/water solution (1,050 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was procured from Tri Chemical Laboratories Inc. (Yamanashi, Japan). Hydrochloric acid (HCl), tin (II) chloride dihydrate ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), potassium iodide (KI), dichloromethane (DCM) and hexadecane (C16) were of analytical grade or better (for atomic adsorption spectrometry or for analysis of poisonous metal). Water was purified with an Elix 5 system (Millipore, Bedford, MA, USA). Standard Reference Material (SRM) 2669 (arsenic species in frozen human urine) was purchased from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA).

SnCl_2 solution was prepared by dissolving $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in HCl (50 mg/ml). KI solution [20% (w/w)] and BAL solution [0.2% (v/v)] were prepared by dissolving KI and BAL, respectively, in water. The extraction solution was DCM containing C16 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) as an internal standard (IS). Standard stock solutions of As(III), As(V) and MMA were prepared in water (100 mg/l as As) and stored in PFA bottles at 4°C.

Urine samples were collected from healthy adult volunteers. These volunteers were not occupationally exposed to arsenic and were under dietary restriction of seafood. Informed consent had been obtained from the volunteers before collection of urine. This study was approved by the Ethics Committees of the Graduate School of Medicine, Osaka City University (approval number 2367).

Instruments

The GC-MS system used was a 7890A gas chromatograph equipped with a 5975C inert XL mass spectrometer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The column was a 30 m \times 0.25 mm ID InertCap 5MS/NP capillary column with a 0.25- μm film thickness (GL Sciences Inc., Tokyo, Japan). Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 ml/min. The temperatures of the injection port and the transfer line were set at 250 and 280°C, respectively. The oven temperature was set at 70°C for 1 minute and then increased to 280°C at a rate of 10°C/min. Samples (2 μl) were injected in the pulsed splitless mode (pulse pressure, 25 psi; pulse time, 1 minute; purge activation time, 0.9 minutes). The mass spectrometer was operated in the electron impact (EI) mode at an electron energy of 70 eV. The ion source and quadrupole analyzer were maintained at 230 and 150°C, respectively. Data were obtained in the selected ion monitoring (SIM)/scan mode. The ions selected for SIM were m/z 197 and 212 for BAL-MMA, m/z 226 and 183 for C16 and m/z 212 and 165 for

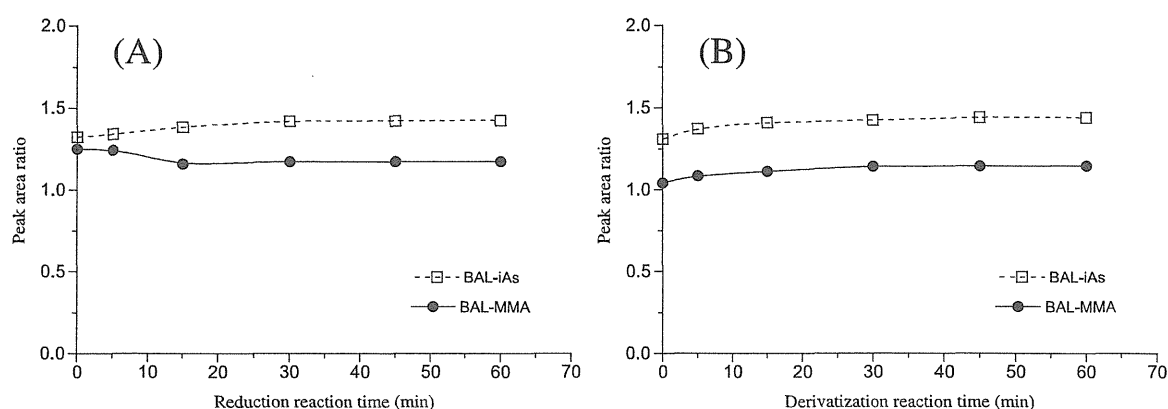


Fig. 1. Effects of the (A) reduction reaction time and (B) derivatization reaction time on the production of the derivatives of inorganic arsenic (BAL-iAs) and monomethylarsonic acid (BAL-MMA).

BAL-iAs, in which the former was selected as the quantifier ion and the latter as the qualifier ion. To confirm the mass fragmentation of the derivatives, data were obtained in scan mode with a scan range from m/z 40 to 250.

Sample preparation

Urine (2 ml) was placed in a glass test tube. SnCl_2 (0.4 ml) and KI (0.2 ml) solutions were added to the tube, which was vortex-mixed (10 seconds) and then allowed to stand for 30 minutes at room temperature. BAL solution (0.2 ml) was added to the tube, which was vortex-mixed (10 seconds) and then allowed to stand for 30 minutes at room temperature. Extraction solution (0.5 ml) was added to the tube and shaken gently for 1 minute to avoid emulsion formation. The mixture was centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes, and a 2- μl aliquot of the extraction solution layer was injected into the GC-MS system.

Method validation

Method validation was conducted according to the US Food and Drug Administration (FDA) guidelines⁹. To plot calibration curves, urine samples spiked with As(III) or As(V) and MMA at six concentrations (matrix-matched standard) ranging from 1 to 100 $\mu\text{g/l}$ were prepared in triplicate, and the prepared samples were analyzed using the procedure for sample preparation described above. Calibration curves were obtained by plotting the peak area ratio of BAL derivatives of As(III), As(V) or MMA to IS against their respective concentrations. The reproducibility, which was defined as precision, of the developed method was evaluated by analyzing urine samples containing three concentrations (1, 25 and 100 $\mu\text{g/l}$) of As(III) or As(V) and MMA on the same day (five replicates; intraday reproducibility) and over three

consecutive days (five replicates; interday reproducibility). Recovery was determined by comparing the responses of the BAL derivative of As(III), As(V) or MMA in spiked urine samples with those of water standards subjected to the same procedure. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were defined as the amounts of As(III), As(V) or MMA in urine that corresponded to 3 and 10 times the baseline noise, respectively. Finally, the accuracy of the proposed method was confirmed using SRM 2669. The obtained results and certified values were compared according to application note 1 of the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)¹⁰.

Results

Optimization of reaction conditions

To determine the optimal reaction conditions, we examined the influences of the reduction reaction time and the derivatization reaction time using urine samples spiked with 100 $\mu\text{g/l}$ each of As(V) and MMA. When the reduction reaction time ranged from 0 to 60 minutes with a derivatization reaction time of 30 minutes, the reduction reaction was complete within a short time, and the BAL-iAs/IS and BAL-MMA/IS peak area ratios remained at a plateau until 60 minutes [Fig. 1(A)]. When the derivatization reaction time ranged from 0 to 60 minutes with a reduction reaction time of 30 minutes, the BAL-iAs/IS and BAL-MMA/IS peak area ratios attained maximum area ratios after 30 minutes and remained constant for 60 minutes [Fig. 1(B)].

Validation

Calibration curves showed linearity in the range 1–100 $\mu\text{g/l}$ for each of the arsenic species, with correlation coefficients of >0.999. For each of the arsenic

Table 1. Range of linearity and correlation coefficient of the proposed method

	Detection limit ($\mu\text{g/l}$)	Range of linearity ($\mu\text{g/l}$)	Linearity		Correlation coefficient
			Slope	Intercept	
As(III)	0.2	1–100	0.0149	0.003	1.000
As(V)	0.2	1–100	0.0146	0.004	1.000
MMA	0.2	1–100	0.0122	–0.005	0.999

As(III): arsenite. As(V): arsenate. MMA: monomethylarsonic acid.

Table 2. Intra- and interday coefficients of variation of the proposed method

Spiked urine concentration ($\mu\text{g/l}$)	Recovery (n = 5)		Intraday (n = 5)			Interday (n = 15)		
	Mean \pm SD (%)	RSD (%)	Mean \pm SD ($\mu\text{g/l}$)	RSD (%)	Accuracy (%)	Mean \pm SD ($\mu\text{g/l}$)	RSD (%)	Accuracy (%)
As(III)								
1	100 \pm 7.4	7.4	0.90 \pm 0.07	7.4	90.3	0.90 \pm 0.04	4.8	89.5
25	97 \pm 0.9	0.9	24.14 \pm 0.23	0.9	96.5	24.28 \pm 0.20	0.8	97.1
100	96 \pm 1.9	2.0	99.79 \pm 2.03	2.0	99.8	99.95 \pm 1.53	1.5	100.0
As(V)								
1	102 \pm 5.7	5.6	0.91 \pm 0.05	5.6	91.1	0.91 \pm 0.09	9.9	90.9
25	99 \pm 1.2	1.2	24.21 \pm 0.30	1.2	96.8	24.33 \pm 0.34	1.4	97.3
100	99 \pm 3.1	3.1	99.66 \pm 3.09	3.1	99.7	99.97 \pm 2.18	2.2	100.0
MMA								
1	107 \pm 6.9	6.4	0.83 \pm 0.05	6.4	82.7	0.81 \pm 0.05	6.2	81.3
25	99 \pm 1.1	1.1	23.17 \pm 0.25	1.1	92.7	23.47 \pm 0.56	2.4	93.9
100	112 \pm 3.0	2.7	99.36 \pm 2.71	2.7	99.4	99.78 \pm 2.80	2.8	99.8

As(III): arsenite. As(V): arsenate. MMA: monomethylarsonic acid. RSD: relative standard deviation.

Table 3. Results for arsenic species in NIST SRM 2669 (Levels I and II)^a

Species	Level I		Level II	
	This method ^b	Certified ^c	This method ^b	Certified ^c
As(III)	—	1.47 \pm 0.10	—	5.03 \pm 0.31
As(V)	—	2.41 \pm 0.30	—	6.16 \pm 0.95
iAs	3.9 \pm 0.0	—	11.4 \pm 0.1	—
MMA	2.4 \pm 0.4	1.87 \pm 0.39	6.9 \pm 0.4	7.18 \pm 0.56

^a Concentrations in $\mu\text{g/l}$ as As. ^b Values are expressed as the mean \pm SD (n=3). ^c Values are expressed as the certified value \pm the expanded uncertainty (95% confidence interval). As(III): arsenite. As(V): arsenate. MMA: monomethylarsonic acid. iAs: inorganic arsenic. NIST: National Institute of Standards and Technology. SRM: Standard Reference Material.

species, LOD and LOQ were 0.2 $\mu\text{g/l}$ and 1 $\mu\text{g/l}$, respectively (Table 1). The recoveries were 96–100%, 99–102% and 99–112% for As(III), As(V) and MMA, respectively. Intraday accuracy, expressed as the deviation from the nominal value, was 82.7–99.8%, and intraday precision, expressed as the relative standard deviation (RSD), was 0.9–7.4%. Interday accuracy and precision were 81.3–100.0% and 0.8–9.9%, respectively (Table 2). The analytical values of SRM 2669 obtained by the proposed method are shown in Table 3.

Discussion

Our goal in the present study was to develop and validate a GC-MS method for the simultaneous determination of iAs and MMA in urine. Several GC methods have been reported for the determination of iAs, MMA or DMA^{8,11–20}. In these methods, derivatizations using various thiols, such as BAL^{8,11}, thioglycol methylate (TGM)^{12–17} and 1,3-propanedithiol (PDT)^{18–20}, were used to enable GC analyses because these arsenic species are essentially non-volatile. For the choice of an optimal derivatizing reagent, we

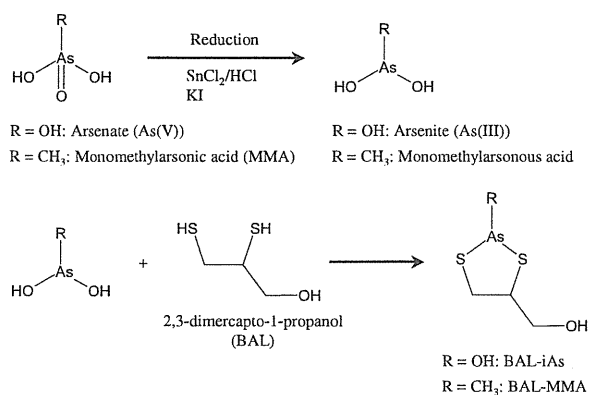


Fig. 2. Reaction scheme of inorganic arsenic and monomethylarsonic acid with 2,3-dimercapto-1-propanol as reported by Fukui *et al.*⁸⁾

initially examined the use of TGM, but this choice was unsuccessful for iAs. Claussen *et al.* suggested that an incomplete reaction of iAs with TGM or decomposition of the derivative after injection into the GC system could be the possible reasons for this failure¹³⁾. Szostek *et al.* also reported decomposition of the derivative in the GC injector¹⁸⁾. We next investigated the use of PDT but did not observe any signal for iAs. In contrast to these derivatizing reagents, BAL showed the best results for iAs and MMA in the derivatization reaction and chromatographic separation. Therefore, we adopted BAL as the derivatizing reagent.

The reaction scheme of iAs and MMA with BAL reported by Fukui *et al.* is presented in Fig. 2⁸⁾. BAL selectively reacts only with arsenic compounds in the trivalent state to give organic solvent-extractable volatile complexes. Therefore, As(V) and MMA in their pentavalent state must be reduced to a trivalent state before derivatization. As(III) and As(V) form the same derivative upon reaction with BAL and are determined as the sum of those derivatives. Typical mass chromatograms of blank urine, standard spiked urine and SRM 2669 level II, as well as the mass spectra of BAL-iAs and BAL-MMA, are shown in Fig. 3. The common major fragment ion in both spectra corresponds to $[\text{AsS}]^+$ at m/z 107. In the mass spectrum of BAL-MMA, the molecular ion $[\text{M}]^+$ of the structure reported by Fukui *et al.* was observed at m/z 212⁸⁾, and the base peak was observed at m/z 197, corresponding to the fragment ion of a demethyl derivative ($[\text{M}-\text{CH}_3]^+$). Other major fragment ions were at m/z 179 $[\text{C}_3\text{H}_4\text{S}_2\text{As}]^+$ and 165 $[\text{C}_2\text{H}_2\text{S}_2\text{As}]^+$. Although the mass spectrum of BAL-MMA agreed with the data of Fukui *et al.* and the peak of BAL-MMA was assigned on the chromatogram, the peak of BAL-iAs with the mass spectrum reported

by Fukui *et al.* was not observed. However, we found a quantitatively detected peak with a different mass spectrum from that found by Fukui *et al.* and denoted it as the peak of BAL-iAs. The fragment ions of BAL-iAs reported by Fukui *et al.* were at m/z 214 ($[\text{M}]^+$), 212, 196, 166 and 107⁸⁾, and Siu *et al.* observed fragment ions of BAL-iAs at m/z 196, 166 and 107¹¹⁾. Our mass spectrum showed major fragment ions at m/z 212, 165 and 107, and the $[\text{M}]^+$ of the expected structure was not observed, even when GC-MS conditions (temperatures of the injection port and ion source and electron energy) were changed. From the difference of these mass spectra, the peak that we regarded to be BAL-iAs may be different from the presented structure in previous studies. Therefore, further studies (including nuclear magnetic resonance analyses) are in progress to determine the exact structure of BAL-iAs.

The derivatization and extraction procedure was performed according to the method of Fukui *et al.* with some modifications, including scale-down of the sample volume and change of extraction solvent⁸⁾. Benzene was used as the extraction solvent in the method of Fukui *et al.* However, benzene is highly toxic. Therefore, we examined if DCM, toluene, hexane, ethyl acetate or ethyl ether could be used as suitable alternate solvents, as they are less toxic than benzene. DCM and toluene showed almost the same extraction efficiency as that of benzene. Hexane and diethyl ether resulted in poor extraction of BAL-MMA. Ethyl acetate was hardly able to extract BAL-MMA and BAL-iAs. We finally chose DCM as the extraction solvent, because it is less toxic than toluene and gave higher peaks. Moreover, we changed the volume ratio of the sample-extraction solvent from 2 to 4 to obtain higher sensitivity. Details of optimal reaction conditions have not been reported previously. Therefore, we confirmed the influence of the reduction time and the derivatization reaction time. From the obtained results, the optimal reaction conditions were found to be a reduction reaction for 30 minutes and a derivatization reaction for 30 minutes as shown in Fig. 1.

The proposed method was validated according to the US FDA guidelines⁹⁾. The accuracy and precision values of the proposed method met the FDA criteria. The proposed method was further validated by analyzing SRM 2669. The obtained results showed that the proposed method had sufficient accuracy, since the results were not significantly different from the certified values according to application note 1 of the IRMM¹⁰⁾ (Table 3). Under the constant GC-MS condition, the robustness of the proposed method was evaluated by using three different columns with the same column size (InertCap 5MS/NP, HP-5MS

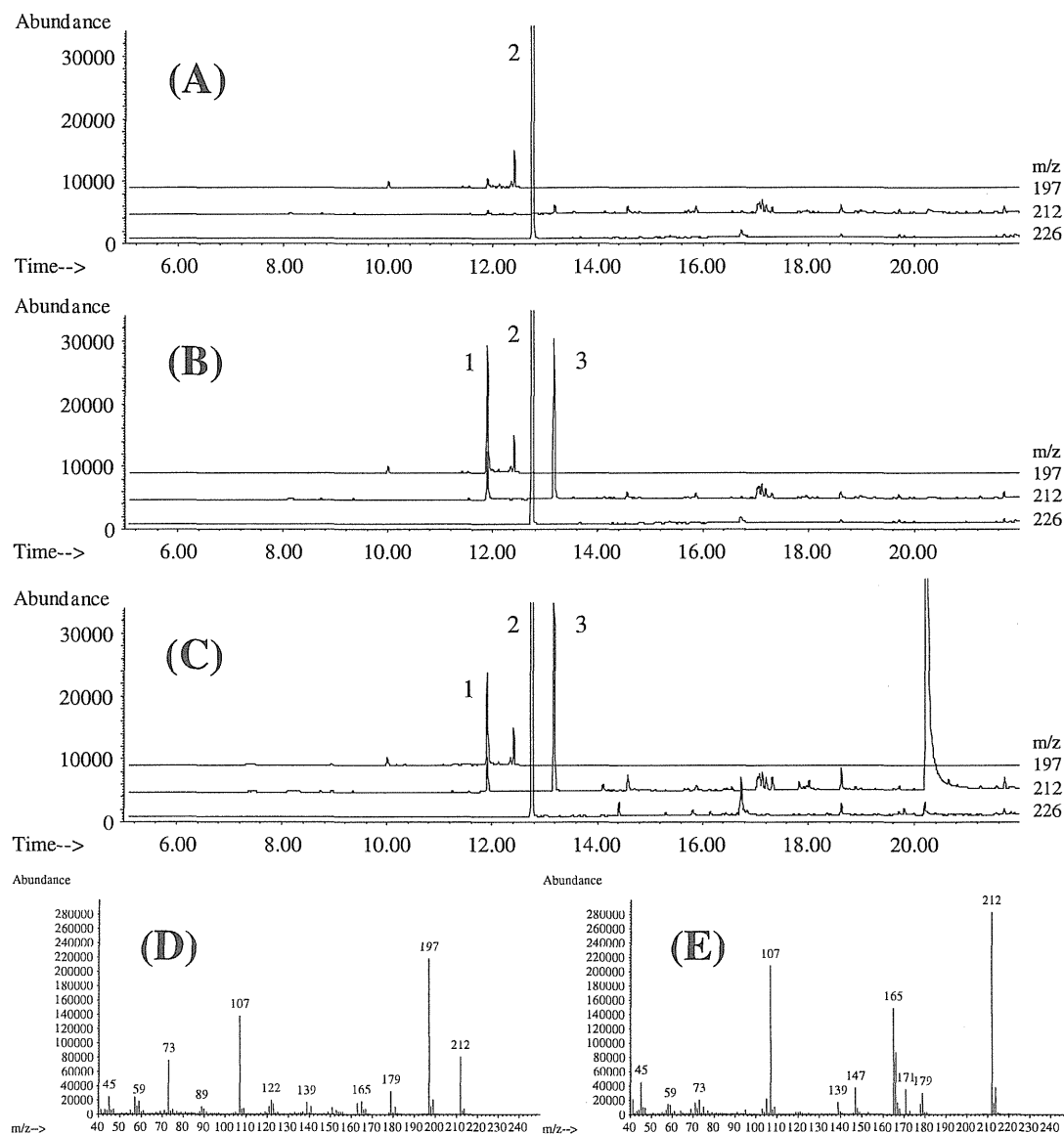


Fig. 3. Typical reconstructed mass chromatograms of a (A) blank urine (MMA, <LOQ; iAs, <LOQ), (B) standard spiked urine (MMA, 10.0 $\mu\text{g/l}$; iAs, 10.0 $\mu\text{g/l}$) and (C) Standard Reference Material (SRM) 2669 level II (National Institute of Standards and Technology) (MMA, 6.8 $\mu\text{g/l}$; iAs, 11.3 $\mu\text{g/l}$). Typical mass spectra of the derivatives of (D) monomethylarsonic acid (BAL-MMA) and (E) inorganic arsenic (BAL-iAs). Peak 1, BAL-MMA; peak 2, internal standard (IS); peak 3, BAL-iAs.

and HP-1MS; Agilent Technologies). There were no observed discrepancies in the chromatographic data. Therefore, the proposed method could be considered to be robust.

In comparison with a previously reported HPLC-ICP-MS method^{5,7)}, the proposed GC-MS method not only showed a similar LOD (HPLC-ICP-MS: 0.2–0.3 $\mu\text{g/l}$) but also had several advantages. The proposed GC-MS method had a higher capability of separation for the use of a capillary column and had

a higher selectivity and higher capability of identification and confirmation of compounds because mass spectra were obtained. Moreover, it does not require expensive reagents, an expensive and complicated instrument system and high running costs. One of the disadvantages of this method was that it could not distinguish As(III) and As(V). Although a speciation analysis was not required in this study, if necessary, it may be achieved by using a sequential procedure for sample preparation. Another disadvantage was that

it required a derivatization procedure and a relatively large volume of urine (2 ml). However, requesting a large volume of urine is not a serious problem in routine analyses at periodic health checkups.

In conclusion, we developed and validated a GC-MS method to simultaneously determine iAs and MMA in urine. The proposed method was a robust, selective and cost-effective method suitable for routine analyses and could be useful for the biological monitoring of occupational exposure to iAs.

Acknowledgment: This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (No. 23390165) from the Japan Society for the Promotion of Science.

References

- 1) International Programme on Chemical Safety (IPCS). Arsenic and arsenic compounds. In: Environmental health criteria 224, 2nd edition. Geneva (Switzerland): World Health Organization (WHO); 2001.
- 2) American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). Arsenic and soluble inorganic compounds. In: Documentation of the TLVs and BEIs with other worldwide occupational exposure values, 7th edition. Cincinnati (OH): ACGIH; 2009.
- 3) Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). Arsenic and inorganic arsenic compounds. In: Drexler H, Greim H, editors. Essential BAT value documentations. Weinheim (Germany): Wiley-VCH; 2006. p. 77–84.
- 4) International Agency for Research on Cancer (IARC). Arsenic and arsenic compounds. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 100, A review of human carcinogens, Part C: Arsenic, metals, fibres, and dusts. Lyon (France): IARC; 2012. p. 41–93.
- 5) Hata A, Endo Y, Nakajima Y, et al. HPLC-ICP-MS speciation analysis of arsenic in urine of Japanese subjects without occupational exposure. *J Occup Health* 2007; 49: 217–23.
- 6) Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW), Japan. An ordinance to revise the portions of the ordinance on industrial safety and health (Ordinance of the MHLW No. 158 of 2008). Tokyo: MHLW; 2008 (in Japanese).
- 7) Suzuki Y, Shimoda Y, Endo Y, Hata A, Yamanaka K, Endo G. Rapid and effective speciation analysis of arsenic compounds in human urine using anion-exchange columns in HPLC-ICP-MS. *J Occup Health* 2009; 51: 380–5.
- 8) Fukui S, Hirayama T, Nohara M, Sakagami Y. Determination of arsenite, arsenate and monomethylarsonic acid in aqueous samples by gas chromatography of their 2,3-dimercaptopropanol (bal) complexes. *Talanta* 1983; 30: 89–93.
- 9) U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA): Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. [Online]. 2001 [cited 2012 May 5]; Available from: URL: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>
- 10) Linsinger T, European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM): Application Note 1, Comparison of a measurement result with the certified value. [Online]. 2010 [cited 2012 May 5]; Available from: URL: http://irmm.jrc.ec.europa.eu/reference_materials_catalogue/user_support/erm_application_notes/application_note_1/Documents/erm_application_note_1_english_rev3.pdf
- 11) Siu KWM, Roberts SY, Berman SS. Derivatization and determination of arsenic in marine samples by gas chromatography with electron capture detection. *Chromatographia* 1984; 19: 398–400.
- 12) Dix K, Cappon CJ, Toribara TY. Arsenic speciation by capillary gas-liquid chromatography. *J Chromatogr Sci* 1987; 25: 164–9.
- 13) Claussen FA. Arsenic speciation of aqueous environmental samples by derivatization with thioglycolic acid methylester and capillary gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr Sci* 1997; 35: 568–72.
- 14) Mester Z, Vitanyi G, Morabito R, Fodor P. Speciation of dimethylarsinic acid and monomethylarsonic acid by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1999; 832: 183–90.
- 15) Mester Z, Horvath G, Vitanyi G, Lelik L, Fodor P. Simultaneous determination of dimethylarsinic acid and monomethylarsonic acid after derivatization with thioglycol methylate by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1999; 13: 350–3.
- 16) Mester Z, Pawliszyn J. Speciation of dimethylarsinic acid and monomethylarsonic acid by solid-phase microextraction-gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2000; 873: 129–35.
- 17) Campillo N, Penalver R, Vinas P, Lopez-Garcia I, Hernandez-Cordoba M. Speciation of arsenic using capillary gas chromatography with atomic emission detection. *Talanta* 2008; 77: 793–9.
- 18) Szostek B, Aldstadt JH. Determination of organoarsenicals in the environment by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1998; 807: 253–63.
- 19) Killelea DR, Aldstadt JH, 3rd. Solid-phase microextraction method for gas chromatography with mass spectrometric and pulsed flame photometric detection: studies of organoarsenical speciation. *J Chromatogr A* 2001; 918: 169–75.
- 20) Roerdink AR, Aldstadt JH, 3rd. Sensitive method for the determination of roxarsone using solid-phase microextraction with multi-detector gas chromatography. *J Chromatogr A* 2004; 1057: 177–83.