

## II. 分担研究報告 3

**有害化学物質摂取量推定に不可欠な分析法開発に関する研究**

**片岡 洋平**

## 平成 25 年度厚生労働科学研究補助金 食品の安全確保推進研究事業

### 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

#### 研究分担報告書

#### 有害化学物質摂取量推定に不可欠な分析法開発に関する研究

研究代表者 渡邊 敬浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部第三室長  
研究分担者 片岡 洋平 国立医薬品食品衛生研究所食品部主任研究官

#### 研究要旨

メチル水銀の暫定的規制値への適合判定やメチル水銀および形態別ヒ素の摂取量推定に不可欠な下記 3 つの研究を実施した。

#### 研究 1) 暫定的規制値への適合判定を目的としたメチル水銀分析法の開発

これまでに開発した分析法の操作手順を見直し、より頑健で操作性に優れた分析法に改良した。改良した分析法の性能を 4 種の認証標準試料、及びメチル水銀標準溶液を用いて調製した添加試料を計画的に分析し、真度と精度を推定した。推定値は、食安発第 0926001 号「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」にしたがって評価した。その結果、推定した真度と精度のすべてがガイドラインの目標値を満たした。このことにより暫定的規制値への適合判定に用いる分析法としての妥当性を確認した。

#### 研究 2) 摂取量推定に使用可能なメチル水銀分析法の開発

摂取量推定に使用可能なメチル水銀分析法を開発するため、測定機器としてより低濃度まで分析可能な、GC-MS/MS を用いる分析法を検討した。検討した分析法を用いて、性能評価用モデル試料の魚介類(10 群)と肉類(11 群)について、メチル水銀標準溶液を用いて調製した添加試料を計画的に分析し、真度と精度を推定した。推定した真度は、10 群試料で 84%、11 群試料で 97%であった。併行精度(RSD%)は 10 群試料で 4.9%、11 群試料で 3.3%であった。

#### 研究 3) 摂取量推定に使用可能な化学形態別ヒ素分析法の開発

2 種の無機ヒ素(亜ヒ酸、ヒ酸)と 6 種の有機ヒ素(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、アルセノベタイン、アルセノコリン、テトラメチルアルソニウム)の選択的な定量分析法の開発を検討した。高速液体クロマトグラフィー - 誘導結合プラズマ質量分析計(HPLC-ICP-MS)による形態別分析法に着目し、無機ヒ素と有機ヒ素を合わせた計 8 つのヒ素化合物を分離し測定するための測定法を検討した。特に毒性が高いとされる無機ヒ素を高分解能で分析可能な ODS カラムの選定、および逆相イオンペアクロマトグラフィーによる分離のための移動相条件の最適化を行った。

研究協力者 菊地博之、林 智子  
松田りえ子  
赤木浩一

国立医薬品食品衛生研究所食品部  
国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部  
福岡市保健環境研究所

## A. 研究目的

水銀やヒ素は、ある官能基により修飾されることで、複数の化学形態を生じ、その化学形態により生体内動態や毒性が異なることが知られている。なかでも、有機水銀化合物の一つであるメチル水銀は、分解されにくい特性を持ち、環境中に蓄積しやすく脂溶性も高いため生物凝縮もされやすい。そのため、生物連鎖の上位に位置する鯨・イルカ・マグロなどの水産物の摂食により、健康危害リスクの高い物質とされる。

同様にヒ素も環境中に多く存在しており、生物濃縮された食品の摂食による健康危害リスクに関心が寄せられている。これまでの報告から、食生活で摂取される大部分のヒ素は海水産物からである。ヒ素化合物には無機ヒ素化合物と有機ヒ素化合物があり、海水産物など食品に含有されるヒ素の化学形態の多くは、毒性が低いとされる有機ヒ素化合物であるとされている。一方で、無機ヒ素化合物である亜ヒ酸やヒ酸は生体内でタンパク質などの生体物質と結合することで毒性が表れるとされ、食品に少ないながらも含有されている。

以上のような背景から、健康危害リスクの影響評価を目的とし、毒性の異なる複数の化学形態が存在する場合には、当該する化学物質を形態別に分析、選択的

に定量する必要がある。こうすることで食品を介したこれら有害物質の摂取量を精密に推定可能であると考えられる。

そこで本研究では、メチル水銀および化学形態別ヒ素について、その分析の目的ごとに感度や選択性などに優れた分析法の構築を目的に下記の3つの研究を実施した。

### 研究 1) 暫定的規制値への適合判定を目的としたメチル水銀分析法の開発

現在、環乳第 99 号により、一部の魚介類を除きメチル水銀には、暫定的規制値として 0.3 ppm が置かれている。この暫定規制値への適合を判定する分析法として、メチル水銀をフェニル誘導体化後、GC-MS で測定する分析法(以下、GC-MS 法)をこれまで検討してきた。

本研究では、より優れた分析法に改良することを目的に、分析法の操作手順を見直し、改良した分析法の性能を評価した。

### 研究 2) 摂取量推定に使用可能なメチル水銀分析法の開発

本研究では、摂取量推定に使用可能なメチル水銀分析法について検討した。精密な摂取量の推定には試料に含有されるメチル水銀を可能な限り低濃度まで分析する必要がある。そのため、分

析機器として GC-MS よりも、分解能と選択性に優れ、より高感度に測定が可能である GC-MS/MS を用いた分析法に GC-MS 法を改良する検討した。

### **研究 3) 摂取量推定に使用可能な化学形態別ヒ素分析法の開発**

現在、コーデックス委員会食品汚染物質部会(CCCF)は、米の国際食品規格の設定に関連し、無機ヒ素を項目とすることを含めて検討が進められている。これは、ヒ素がその化学形態によって毒性が大きく異なる事実に基づいている。日本では食品からのヒ素の摂取量において、米の寄与が大きいことが明らかになっているが、規制値は設定されていない。ヒ素は以前から分析されてきているが、化学形態別ではなく総ヒ素として分析されてきた。しかし、人への健康影響を検討する上では、総ヒ素の摂取量だけでなく、化学形態別ヒ素の摂取量を知ることが重要である。

本研究では、有害物質摂取量推定の目的に合致した形態別ヒ素摂取量推定を目的とし、そのための形態別ヒ素定量分析法を検討した。論文等でこれまでに報告があり、測定の際に形態別ヒ素の分離に汎用的な HPLC とその検出に ICP-MS を利用した分析法に着目した。本年度は、より選択的に高感度測定を可能とすることを目的に、HPLC の測定条件といった分析法の改良に必要な基礎検討を実施した。

## **B. 研究方法**

### **研究 1) 暫定的規制値への適合判定を目的としたメチル水銀分析法の開発**

#### **試料**

##### 認証標準試料

認証標準試料(CRM 7402-a:タラ魚肉粉末、BCR-463:マグロ魚肉粉末、ERM-CE464:マグロ魚肉粉末、CRM 7403-a:メカジキ魚肉粉末)は、西進商事(株)を通じ入手した。また、分析時には、1.0 g を量りとり、水 9.0 g を加え混合したものを試料とした。

##### 魚試料

東京都内のスーパーマーケットで購入したタラ、キハダマグロ、メバチマグロ、サバ、カツオの切り身を用いた。購入した切り身を GM200(レッチェ社製)により十分に混合することで試料を調製した。

#### **試薬等**

塩化メチル水銀は、ジーエルサイエンス社製のものを用いた。臭化カリウム、無水硫酸銅(II)、硫酸、システイン塩酸塩一水和物、酢酸ナトリウム三水和物、りん酸二水素ナトリウム二水和物、りん酸水素二ナトリウム十二水和物、テトラフェニルホウ酸ナトリウム、ポリエチレングリコール 200(PEG 200)は、和光純薬工業社製のものを使用した。その他の試薬類は残留農薬分析用

または試薬特級に準じたものを使用した。

水：メルク社製装置(Element A10)により製造した超純水(比抵抗 > 18.2M $\cdot$ cm、TOC < 3 ppb)を用いた。

メチル水銀標準原液(1000  $\mu$ g/mL)：塩化メチル水銀標準品 58.2 mg を正確に量りとり、トルエンで 50 mL に定容した。

添加用メチル水銀標準溶液(3  $\mu$ g/mL)：塩化メチル水銀 58.2 mg を正確に量りとり、水に溶解し正確に 500 mL とした。本溶液 3 mL を正確に取り、水で 100 mL に定容した。

1 mol/L 臭化カリウム溶液：臭化カリウム 119.0 g を量りとり水で 1 L に定容した。

硫酸銅(II)飽和 4 mol/L 硫酸：水 600 mL に濃硫酸 200 mL を加え、放冷後、水で 900 mL に定容した後、無水硫酸銅(II)を飽和するまで溶解した。

1% L-システイン溶液：L-システイン塩酸塩一水和物 10.0 g、酢酸ナトリウム三水和物 8.0 g、無水硫酸ナトリウム 125.0 g を量りとり、水で 1 L に定容した。

0.2 mol/L リン酸緩衝液(pH 7.0)：第一液として、リン酸二水素ナトリウム二水和物 31.2 g を量りとり、水で 1 L とした。第二液として、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 71.6 g を量りとり、水で 1 L とした。第一液 380 mL と第二液 610 mL を混合し、第一液を用いて

pH を 7.0 に調整した。

1%テトラフェニルホウ酸ナトリウム溶液：テトラフェニルホウ酸ナトリウム 0.2 g を量りとり、0.2 mol/L リン酸緩衝液(pH 7.0)で 20 mL に定容した。本溶液は、用事調製した。

1.5 mg/mL ポリエチレングリコール 200(PEG200)溶液：PEG200 150 mg を量りとり、トルエンで 100 mL とした。

## **分析機器**

遠心分離機：久保田商事社製高速冷却遠心機 model 6200 を用いた。

GC-MS：Agilent 社製 6890N GC 及び 5975 MSD を用いた。

## **GC-MS 測定条件**

カラム：InertCap 5MS/NP (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25  $\mu$ m)

オープン温度：70 (1 min) 20 /min 280 (5 min)

注入口温度：250

トランスファライン温度：280

イオン源温度：230

注入量：1  $\mu$ L

キャリアガス流量：1.0 mL/min (He)

イオン化法：EI

分析モード：SIM

モニターイオン： $m/z$  292\*、294、277

\*定量イオン

## **メチル水銀分析法(GC-MS 法)**

暫定的規制値への適合判定を目的と

し、改良したメチル水銀分析法を以下に示した。また、操作のフローチャートを図 1 に示した。

### **試料の前処理**

試料 10.0 g にアセトン 100 mL を加え 30 秒間振とうした後、1,880 g で 5 分間遠心分離し、デカンテーションによりアセトンを除去した。残渣にトルエン 100 mL を加え、同様に操作した。

### **抽出**

前処理した試料に、1 mol/L 臭化カリウム溶液 40 mL、硫酸銅(II)飽和 4 mol/L 硫酸 40 mL 及びトルエン 80 mL を加えて、振とう機で 30 分間振とうした。1,880 g で 20 分間遠心分離した後、上層のトルエン層を 200 mL の分液漏斗に移した。再度、水層にトルエン 50 mL を加え、振とう機で 10 分間振とうした。同様に遠心分離後、トルエン層を上記の分液漏斗に合わせた。

### **転溶**

トルエン層に 1% L-システイン溶液 50 mL を加え 5 分間振とうした。静置後、水層を 200 mL の分液漏斗に移した。これに 6 mol/L 塩酸 30 mL、トルエン 30 mL を加え 5 分間振とうし、トルエン層を 100 mL メスフラスコに移した。上記と同様の操作をあと 2 回繰り返して、トルエンで 100 mL に定容した。

### **メチル水銀のフェニル誘導体化**

試験管に定容後のトルエン溶液 4 mL を正確に量りとり、0.2 mol/L リン酸緩衝液(pH 7.0) 5 mL、1% テトラフェニルホウ酸ナトリウム溶液 1 mL を加えた。室温で 10 分間振とうした。

### **測定溶液の調製**

誘導体化反応後の溶液を 840 g で 10 分遠心分離し、トルエン層をガラスチューブに移し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。脱水したトルエン溶液 1 mL を正確にバイアルに量りとり、1.5 mg/mL PEG200 0.5 mL を正確に加え測定溶液とした。

### **検量線の作成**

メチル水銀標準原液を適宜量りとり、トルエンで希釈することにより、検量線作成用溶液を調製した。その濃度は、0、5、10、25、50、75 及び 100 ng/mL とした。試料と同様に、これらの検量線作成用溶液もフェニル誘導体化以降の操作を行い、検量線用測定溶液を調製した。検量線用測定溶液 1  $\mu$ L を GC-MS に注入し、メチル水銀の誘導体であるメチルフェニル水銀測定値(ピーク面積)のメチル水銀濃度に対する一次回帰式を最小二乗法により求め、検量線を作成した。

### **測定及びメチル水銀濃度の算出**

測定溶液を GC-MS に注入し、測定値

を得た。次いで、作成した検量線の各変数を用い、下式に従い、測定溶液中のメチル水銀濃度を逆推定した。

測定溶液中のメチル水銀濃度(mg/kg)

$$= (\text{Signal}_{\text{analyte}} - \text{intercept}) / \text{slope}$$

Signal<sub>analyte</sub>:メチルフェニル水銀の測定値

Intercept:検量線の切片

Slope:検量線の傾き

その後、測定溶液中濃度に分析操作による希釈の倍率である 0.1 を乗じ、試料中メチル水銀濃度を算出し、定量値とした。

### **分析法の妥当性確認**

分析法の性能を評価するために、4 種の認証標準試料及び 2 種の添加試料を計画的に分析して得られた定量値の解析結果から、真度と精度を推定した。具体的な分析計画を以下に示す。

認証標準試料:1 日に 4 種の試料をそれぞれ 2 併行で分析し、この分析を 5 日間実施した。

添加試料:1 日に タラ、キハダマグロのブランク試料と添加試料をそれぞれ 2 併行で分析し、この分析を 5 日間実施した。

ブランク試料は、予め各試料を GC-MS 法により分析し、メチル水銀が各試料共に 0.1 mg/kg 未満であること

を確認した。

添加試料は、ブランク試料 10.0 g に、添加用メチル水銀水溶液(3 µg/mL)を正確に 1 mL 加え、よく混合し 30 分間静置したものを試料とした。

各添加試料から得られた分析値から、対応する全ブランク試料から得られた分析値の平均値を差し引いた後、真度と精度を推定した。本性能評価は、国立医薬品食品衛生研究所と福岡市保健環境研究所で実施した。国立医薬品食品衛生研究では分析者 2 名、福岡市保健環境研究所では分析者 1 名でそれぞれ独立して分析を実施した。推定値は、食安発第 0926001 号「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」にしたがって評価した。

### **研究 2) 摂取量推定に使用可能なメチル水銀分析法の開発**

#### **試料**

摂取量推定を目的とした分析に使用する分析法の性能を評価するためのモデル試料 Sample for Evaluation of Methods Performance(以下、SEMP)を用いた。

また、水銀はこれまでの本研究課題の成果として、ほぼ魚介類(10 群)と肉類(11 群)からしか検出されず、かつ 10 群摂取量の寄与が支配的であることが明らかとされている。そこで、メチル水銀の摂取量に寄与する割合が比較的

大きいと考えられる、10群と11群の試料を用いた。

### **試薬等**

研究1と同じ試薬を用いた。

### **分析機器**

GC-MS/MS：サーモフィッシャーサイエンティフィック社製 TRACEGC ULTRA 及び TSQ Quantum を用いた。

### **GC-MS/MS 測定条件**

カラム：InertCap 5MS/NP (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm)

オープン温度：70 (1 min) 10 /min 160 (0 min) 20 /min 280 (5 min)

注入口温度：250

トランスファライン温度：280

イオン源温度：280

注入量：1 μL

キャリアガス流量：1.0 mL/min (He)

イオン化法：EI

分析モード：SRM

モニターイオン： $m/z$  294 279(定量イオン)、 $m/z$  292 277(確認イオン)

### **メチル水銀分析法(GC-MS/MS 法)**

開発した摂取量推定を目的とするメチル水銀分析法を以下に示す。

### **試料の前処理～測定溶液の調製、測定及びメチル水銀濃度の算出**

前述した GC-MS 法にしたがった。

### **検量線の作成**

検量線用測定溶液の調製方法は前述した GC-MS 法にしたがったが、その濃度は、0、0.5、1、2.5、及び 5 ng/mL とした。

### **研究3) 摂取量推定に使用可能な化学形態別ヒ素分析法の開発**

### **試薬等**

硝酸 1.42(超微量分析用)、25%テトラメチルアンモニウムヒドロキシド(以下、TMAH)(精密分析用)、1-ブタンスルホン酸ナトリウム、マロン酸(特級)、メタノール(液体クロマトグラフィー用)、メチルオレンジ(特級)、25%アンモニア水(有害金属測定用)は和光純薬社製のものを用いた。

水：メルク社製装置(Element A10)により製造した超純水(比抵抗 > 18.2M · cm、TOC < 3 ppb)を用いた。

標準品：下記の8種類を使用した。

As( )：ヒ素標準液(As 100) (和光純薬社製)

As(V)：ヒ酸[As(V)] 水溶液 (NMIJ CRM 7912-a)

アルセノベタイン水溶液(NMIJ CRM 7901-a)

ジメチルアルシン酸水溶液(NMIJ CRM 7913-a)

メチルアルソン酸、アルセノコリンブ

ロマイド、トリメチルアルシンオキシド、ヨウ化テトラメチルアルソニウム (トリケミカル研究所製)

標準原液：メチルアルソン酸、アルセノコリン、トリメチルアルシンオキシド、テトラメチルアルソン酸については各 1000 mg/L になるように、それぞれ下記のとおり標準原液を調製した。

・メチルアルソン酸標準品 50 mg を正確に量りとり、水で 50 mL に定容した。

・アルセノコリンプロマイド標準品 74.2 mg を正確に量りとり、水で 50 mL に定容した。

・トリメチルアルシンオキシド標準品 50.0 mg を正確に量りとり、水で 50 mL に定容した。

・ヨウ化テトラメチルアルソニウム標準品 97.0 mg を正確に量りとり、水で 50 mL に定容した。

上記以外のヒ素化合物については、購入した水溶液を標準原液として用いた。

0.15 mol/L 硝酸溶液：硝酸 4.8 mL を量りとり、水で 500 mL に定容した。

メチルオレンジ溶液：メチルオレンジ 0.1 g を量りとり、水で 100 mL に定容後、孔径 0.45 μm のディスミックフィルター(アドバンテック東洋社製)でろ過した。

2.5% アンモニア水：25%アンモニア水 5 mL を水で 50 mL に定容した。

HPLC 用移動相：25% TMAH 0.3645 g、1-ブタンスルホン酸ナトリウム 1.922 g、マロン酸 0.416 g、メタノール 0.5 mL

を量りとり、水を加え、25%アンモニア水で pH3.0 に調整した後、1 L に定容した。なお、この溶液は用事調製した。

### **分析機器**

HPLC：島津製作所社製 Prominence を用いた。

ICP-MS：サーモフィッシャーサイエンティフィック社製 X-Series2 を用いた。

### **HPLC 測定条件**

カラム：L-column2(内径 4.6 mm 長さ 25 cm 粒子径 3 μm) (化学物質研究評価機構社製)

移動相：0.05%(v/v) メタノール、12 mM 1-ブタンスルホン酸ナトリウム、4 mM マロン酸、1 mM TMAH 溶液(pH3.0)

流速：0.75 mL/min

カラム温度：25

オートサンプラー温度：4

注入量：20 μL

測定時間：15 min

### **ICP-MS 測定条件**

測定モード：CCT モード

(コリジョンモード)

コリジョンガス：He

測定ポイント時間：50 ms

測定質量数：75

その他の条件は、機器の自動チューニングプログラムによって設定した。

### **測定溶液の調製**

検討に用いた測定溶液の調製方法を以下に示した。なお、測定溶液は各ヒ素化合物の濃度が 10 ng/mL となる混合溶液とした。

各標準原液を適量量りとり、0.15 mol/L 硝酸溶液を 10 mL 加えた。これにメチルオレンジ溶液をパスツールピペットで一滴(約 10  $\mu$ L)加え、2.5%アンモニア水で約 pH3 に調整し水で 50 mL に定容した。

#### C.D. 研究結果及び考察

##### **研究 1:暫定的規制値への適合判定を目的としたメチル水銀分析法の開発**

##### C.D. 1-1 メチル水銀分析法(GC-MS法)の改良

##### C.D. 1-1-1 測定溶液の調製に用いるポリエチレングリコール(PEG)と注入量の検討

改良前の GC-MS 法では、測定時に機器への吸着を疑い、それによるメチルフェニル水銀の損失を抑えることを目的に、測定溶液にポリエチレングリコール 300(PEG300)を混合して測定溶液を調製することを手順としていた。

本検討では、メチルフェニル水銀の損失を抑えることにより適した PEG を選定するための検討をした。この時、メチルフェニル水銀の分子量を考慮し、PEG200 と PEG300 について検討した。

メチルフェニル水銀標準溶液に PEG200 と PEG300 が 250、500、750 ng 共注入されるように測定溶液をそれぞれ調製し、1  $\mu$ L を GC-MS 測定した。

PEG200 もしくは PEG300 の共注入量とメチルフェニル水銀のピーク面積、SN 比の関係を図 2-1 および図 2-2 に示した。図 2-1 より、ピーク面積は PEG 注入量とともに僅かに増加したが、PEG200 と PEG 300 では効果に差がないと判断した。

以上の結果より、PEG200 は PEG 300 よりも沸点が低く、GC カラムの昇温条件での最終到達温度を下げる事が可能であるため、PEG200 を共注入する PEG に選択した。かつ、PEG200 は分析対象外であるため、必要以上に注入することによる測定機器への汚染なども考慮して、測定溶液への PEG200 の共注入量は必要最小量の 500 ng とした。

一方、改良前の GC-MS 法では測定溶液の GC-MS への注入量を 2.5  $\mu$ L としていた。しかし、図 2-2 より注入量 1  $\mu$ L の場合でも、2.5 ng/mL メチルフェニル水銀溶液における SN 比が 40 以上のクロマトグラムが得られた。この濃度は暫定規制値に相当する濃度(メチルフェニル水銀として 30 ng/mL)の 1/10 以下の濃度であり、この時の SN 比が 10 以上であることなどから、注入量を減少させても問題ないと判断した。したがって、GC-MS への注入量を 1  $\mu$ L に変更することとした。

##### C.D. 1-1-2 試料マトリクスが測定溶液におよぼす影響の検討

C.D.1-1-1 の検討では、標準溶液を用いた検討であったが、本検討では試料由来のマトリクス存在下における PEG200 によるメチルフェニル水銀の損失抑制効果を検討した。検討は、試料由来のマトリクスの有無と PEG200 共注入の有無でメ

チルフェニル水銀のピーク面積を比較した。

魚試料(タラ、メバチマグロ、カツオ、サバ)から調製したメチルフェニル水銀溶液に PEG200 の共注入した測定溶液と添加しない測定溶液の 2 種類を調製し、GC-MS で測定した。また、メチル水銀標準溶液も同様に操作した。なお、これら測定溶液の調製は 3 併行で行った。結果を表 1 に示した。

表 1 より、試料由来のマトリクスの有無に関わらず全ての測定溶液で PEG200 を共注入した方が共注入しない場合に比べ、ピーク面積が平均で 1.51~1.62 倍に高くなった。また、その比は測定の際のばらつきによる変動を考慮しても、同程度であると判断した。

以上の結果より、試料由来のマトリクスの有無に因らず、PEG200 によるメチルフェニル水銀の損失抑制効果は得られると判断した。逆に、試料由来マトリクスによるメチルフェニル水銀の損失抑制効果は、PEG200 による抑制効果よりも小さいことが示唆された。

#### C.D. 1-1-3 PSA カラムによる精製操作の検討

改良前の GC-MS 法では、メチル水銀のフェニル誘導体化反応後の溶液を PSA カラムにより精製し、測定溶液を調製することを手順としていた。これは、フェニル誘導体化反応後の溶液に含まれる試料由来のマトリクスや誘導体化試薬などの除去を目的とするものであった。本検討では、精製の効果を検証し、カラム精製の有効性について検討した。検討は、

カラム精製の有無で SIM のクロマトグラムおよびメチルフェニル水銀のピーク面積を比較した。

魚試料(タラ、メバチマグロ、カツオ、サバ)から調製したメチルフェニル水銀溶液に、PSA カラム精製して調製した測定溶液と PSA カラム精製せず調製した測定溶液の 2 種類を調製し、GC-MS 測定した。また、メチル水銀標準溶液も同様に操作した。なお、これら測定溶液の調製は 3 併行で行った。

メチル水銀標準溶液および魚試料のクロマトグラムを図 3 に示した。また、各メチルフェニル水銀のピーク面積の結果を表 2 に示した。

図 3 より、カラム精製の有無によるクロマトグラムの変化は認められなかった。また、表 2 より、標準溶液を試料とした場合には、カラム精製有りの場合のピーク面積の平均値とカラム精製無しの場合のピーク面積の平均値の比は 1.01 であった。一方、魚試料でのカラム精製有りの場合のピーク面積の平均値とカラム精製無しの場合のピーク面積の平均値の比は、タラで 1.00、メバチマグロで 1.01、サバで 1.00、カツオで 1.00 となり、いずれも 1 に近い値が得られた。ピーク面積の変動を考慮しても、カラム精製の有無によるピーク面積の大きさは同程度と判断した。

以上の結果から、PSA カラム精製の有無によるクロマトグラムやピーク面積への影響はほとんどなく、精製の効果も少ないと評価し、PSA カラム精製の操作は分析手順から除くこととした。

## C.D. 1-2 メチル水銀法(GC-MS法)の妥当性確認

C.D. 1-1-1 ~ C.D. 1-1-3 で改良した GC-MS 法の妥当性を確認した。

各試料から得られた定量値の解析結果に基づき推定された真度、併行精度並びに室内精度を表 3-1 及び表 3-2 に示した。国立医薬品食品衛生研究所で実施した 2 名の分析者から得られたデータを国立医薬品食品衛生研究所 1 および国立医薬品食品衛生研究所 2 と表記した。

国立医薬品食品衛生研究所 1 で実施した認証標準試料を対象とした場合の推定された真度は 87 ~ 98%、併行精度(RSD%)は 0.8 ~ 6.0%、室内精度(RSD%)は 3.9 ~ 6.5%であった。また、添加試料を対象とした場合では、推定された真度は、タラで 89%、キハダマグロで 88%であった。併行精度(RSD%)は、タラで 1.2%、キハダマグロで 6.7%、室内精度(RSD%)は、タラで 5.0%、キハダマグロで 8.1%であった。

国立医薬品食品衛生研究所 2 で実施した認証標準試料を対象とした場合の推定された真度は 94 ~ 97%、併行精度(RSD%)は 0.9 ~ 3.0%、室内精度(RSD%)は 1.6 ~ 4.3%であった。また、添加試料を対象とした場合では、推定された真度は、タラで 95%、キハダマグロで 98%であった。併行精度(RSD%)は、タラで 4.4%、キハダマグロで 6.3%、室内精度(RSD%)は、タラで 4.4%、キハダマグロで 7.6%であった。

福岡市保健環境研究所で実施した認証標準試料を対象とした場合の推定された真度は 85 ~ 92%、併行精度(RSD%)は 3.6 ~ 6.7%、室内精度(RSD%)は 6.1 ~ 7.3%であ

った。

これらの結果は、分析者や試料によらず、測定結果から推定された真度及び精度が、ガイドラインの目標値を満たしていた。

以上より、暫定規制値への適合判定に用いる分析法の性能としての妥当性を確認した。

## 研究 2: 摂取量推定に使用可能なメチル水銀分析法の開発

### C.D. 2-1 GC-MS/MS 測定条件の検討

#### C.D. 2-1-1 プリカーサーイオンの検討

メチルフェニル水銀のフラグメントパターンを確認するため、 $m/z$  50 ~ 500 の範囲でスキャン測定した。図 4 に、そのマススペクトルを示した。分子イオンピーク  $m/z$  294、292 は、それぞれ、 $\text{Me}^{202}\text{HgPh}^+$ 、 $\text{Me}^{200}\text{HgPh}^+$  に由来するピークと考えられた。また、フラグメントイオン  $m/z$  279、277 は、それぞれ、分子イオンからメチル基が脱離した  $^{202}\text{HgPh}^+$ 、 $^{200}\text{HgPh}^+$  に由来するピークと推定した。イオン強度が最も高いピーク(基準ピーク)の  $m/z$  77 は、 $\text{C}_6\text{H}_5^+$  に由来するイオンと考えられた。

以上の結果より、質量数が 200 と 202 である水銀を含む分子イオンピークを一定の強度で確認した、 $m/z$  294 と 292 をプリカーサーイオンに設定した。

#### C.D. 2-1-2 プロダクトイオンの検討

2 種のプリカーサーイオンの、それぞれに最適なプロダクトイオンを選択するために、コリジョンエネルギーを変化させてプロダクトイオンの検討を行った。コリジョンエネルギーの条件を 5、10、15、20 V と変化させ、プロダクトイオン

の強度を比較した。結果を表 4 に示した。いずれのコリジョンエネルギーの条件でも、 $m/z$  294 をプリカーサーイオンとした場合は、プロダクトイオン  $m/z$  279 が、 $m/z$  292 をプリカーサーイオンとした場合は、 $m/z$  277 のみが主なプロダクトイオンとして検出された。また、コリジョンエネルギーが 5V のときにプロダクトイオン強度が最大となった。

以上の結果より、最適なコリジョンエネルギーは 5V と判断し、プリカーサーイオン  $m/z$  294 と 292 のプロダクトイオンとしてそれぞれ  $m/z$  279 と 277 を選択した。また、 $m/z$  279 の方が  $m/z$  277 と比較して、プロダクトイオン強度が高かったため、 $m/z$  279 を定量イオン、 $m/z$  277 を確認イオンと設定した。

#### C.D. 2-2 検量線用測定溶液濃度の検討

GC-MS/MS の使用により高感度測定が可能であるため、GC-MS 法の検量線の最低濃度よりもさらに低い濃度で検討した。0、0.1、0.5、1、2.5 及び 5 ng/mL の濃度のメチル水銀標準溶液から調製したメチルフェニル水銀溶液を GC-MS/MS で測定した。0~5 ng/mL まで順に測定する一連の測定を 1 回として、この測定を 5 回繰り返し、1 回の測定ごとに、そのピーク面積から検量線をそれぞれ作成した。

表 5 に測定により得られた、SN 比、戻しバイアスを示した。戻しバイアスとは、検量線の作成に使用した信号を作成した検量線により検量して得られる値を戻し値とした時、下記の式で求められる値である。  
戻し値バイアス(%)=(戻し値-規定濃度)/

規定濃度 × 100

以上の結果より、SN 比 10 以上、戻しバイアス 15%程度を指標に、SN 比の変動も考慮して検量線用測定溶液の濃度を 0、0.5、1、2.5、5 ng/mL と決定した。

#### C.D. 2-3 GC-MS/MS 法の真度と併行精度の推定

SEMP の 10 群と 11 群試料を 4 点併行で分析した結果から分析法の真度と併行精度を推定した。予め各試料を GC-MS/MS 法により分析し、メチル水銀が 11 群試料では含まれていなかったものの、10 群試料では 0.03 mg/kg 未満であることを確認した。

真度と精度を確認するための添加試料としては、上記の確認を行った後、ブランク試料 50.0 g に、添加用メチル水銀水溶液(10 群では 2.5 µg/mL、11 群では 0.25 µg/mL)を正確に 1 mL 加え、よく混合し 30 分間静置して調製した。これを 10.0 g 量りとり、分析に用いた。

添加試料の分析結果から推定した真度と併行精度を表 6 に示した。4 併行分析結果の平均値と添加量との比率として推定した真度は、10 群試料で 84%、11 群試料で 97%であった。併行精度(RSD%)は 10 群試料で 4.9%、11 群試料で 3.3%であった。

#### 研究 3: 摂取量推定に使用可能な化学形態別ヒ素分析法の開発

今年度の検討としては、化学形態別ヒ素の測定法の検討を行った。既報<sup>1)2)</sup>を参考に化学形態別ヒ素の測定法として、HPLC を用いて ODS カラムにより分離し、

ICP-MS で検出する HPLC-ICP-MS 法を選択した。この方法における HPLC の分離モードは、ブタンスルホン酸を主なイオンペア試薬とした、逆相イオンペアクロマトグラフィーである。検討では、既報と同じ HPLC の測定条件を初期条件に設定し、よりよいピーク分離のために測定条件の改良を試みた。HPLC による測定の初期条件を表 7 に示した。

1) Nishimura, T., Nagaoka, H, M., Sakakibara, N., Abe, T., Maekawa, Y., Maitani, T. Determination Method for total arsenic and partial-digestion method with nitric acid for inorganic arsenic speciation in several varieties of rice. J. Food Hyg. Soc. Jpn., 51, 178-181 (2010)

2) Nagaoka, M. H., Nishimura, T., Matsuda, R., Maitani, T. Evaluation of a Nitric Acid-based Partial-digestion Method for Selective Determination of Inorganic Arsenic in Rice. J. Food Hyg. Soc. Jpn., 49, 95-99 (2008)

### C.D. 3-1 分析対象化合物の選定

ヒ素はその形態別に、無機ヒ素と有機ヒ素に分類される。無機ヒ素には 亜ヒ酸：As(III) や 五ヒ酸：As(V) があり、有機ヒ素には主に、(モノ)メチルアルソン酸：MMA、ジメチルアルシン酸(別名：カコジル酸)：DMA、トリメチルアルシンオキサイド：TMAO、アルセノベタイン：AsB、アルセノコリン：AsC、テトラメチルアルソニウム：TeMA、アルセノシュガーがある。このうちアルセノシュガーについては、標準品が入手不可であるため、検討を行う化学形態

別ヒ素の項目としては、アルセノシュガーを除く標準品が入手可能な 8 化合物とした。

### C.D. 3-2 HPLC カラムの検討

最初に HPLC による測定法の初期条件で 100% の混合標準溶液の測定をした。結果を図 5-1 に示した。その結果、As(III) と MMA のピークがよくないことが判明した。無機ヒ素の方が有機ヒ素よりも毒性が高いことを考慮すると、無機ヒ素と有機ヒ素とを分別して定量する能力が重要であり、これらのピークが十分に分離していることが必要である。そこで、As(III) と MMA の分離がよい HPLC カラムの検討を行った。国内メーカーの HPLC カラムでエンドキャップがよいとされる製品を中心に選択した。また、理論段数が高まることによるピーク分離度の向上および分析時間の短縮を目的に、充填剤の粒子径が 3 μm の製品で検討した。検討した HPLC カラムを表 8 に、結果を図 5-2 に示した。

その結果、同じ ODS カラムでも製品の違いにより、無機ヒ素と有機ヒ素の分離が異なることが判明した。しかし、As(III) と MMA のピークを完全に分離できる HPLC カラムはなかったため、検討した中では最も As(III) と MMA の分離がよかった L-column2 を選択することにした。

### C.D. 3-3 HPLC 移動相条件の検討

他のカラムに比べると、L-column2 での TMAO と TeMA の分離が良いとは言えない。分析法開発の本来の目的からすると、これら 2 つの有機ヒ素の分離は問題

とはならないが、検討としては有益と考え、これら 2 種の有機ヒ素も完全に分離できるようにならないか、移動相の組成を検討した。移動相に添加しているイオンペア試薬は下記の 2 種類あり、その濃度を検討した。

1) 1-ブタンスルホン酸ナトリウム(塩基性用イオンペア試薬： $C_4H_9-SO_3^- Na^+$ )

2) TMAH(酸性用イオンペア試薬： $(CH_3)_4-N^+ OH^-$ )

まず、1-ブタンスルホン酸ナトリウムの濃度のみを初期条件から変更して検討を行った。このときの 1-ブタンスルホン酸ナトリウムの濃度の範囲は、8 mM ~ 14 mM とした。結果を図 6-1 に示した。その結果、1-ブタンスルホン酸ナトリウムの濃度が初期条件から高くても、逆に低くても TMAO と TeMA のピーク同士が重なることが判明した。そこで、選択する 1-ブタンスルホン酸ナトリウムの濃度として、10 mM と 12 mM を候補とした。

次に、TMAH の濃度のみを初期条件から変更して検討を行った。このときの TMAH の濃度の範囲は、1 mM ~ 8 mM とした。結果を図 6-2 に示した。その結果、TMAH の濃度が低いほど TMAO と TeMA のピークの分離度が高くなる傾向が認められた。したがって、選択する TMAH の濃度として、1 mM と 2 mM を候補とした。

最後に、1-ブタンスルホン酸ナトリウムと TMAH について、候補とした濃度を組み合わせて TMAO と TeMA のピークの分離を検討した。結果を図 6-3 に示した。その結果、1-ブタンスルホン酸ナトリウムの濃度が 10mM、TMAH の濃度が 1 mM

の組み合わせが最も TMAO と TeMA のピークの分離度が高かったが、逆に As( ) と MMA のピークの分離度は検討した組み合わせの中では低い方であった。そのため、TMAO と TeMA のピークの分離以外に、As( ) と MMA および DMA と AsB のピークの分離なども考慮して、1-ブタンスルホン酸ナトリウムの濃度は 12mM、TMAH の濃度は 1 mM を選択することとした。

以上の結果より、HPLC の移動相を 0.05 % メタノール、12 mM 1-ブタンスルホン酸ナトリウム、1 mM TMAH、4mM マロン酸の溶液(pH3)とした。

## E. 結論

### **研究 1：暫定的規制値への適合判定を目的としたメチル水銀分析法の開発**

これまでに検討したフェニル誘導体化 GC-MS 法の改良を検討し、その頑健性や操作性が向上した。また、複数の魚試料を用いて構築した分析法の性能を評価し、暫定的規制値への適合判定を行う分析法として、妥当な分析結果を得られる方法であると判断した。

### **研究 2: 摂取量推定に使用可能なメチル水銀分析法の開発**

研究 1 で改良した GC-MS 法を GC-MS/MS を測定機器に用いることで、選択性と感度のより優れた分析法に改良した。これにより、試料に含まれるより微量のメチル水銀の定量が可能となった。今後は、必要に応じてさらなる改良の検討を行い、TD 試料や様々な食品を用いたメチル水銀の摂取量推定をしていく予定

である。

### **研究 3: 摂取量推定に使用可能な化学形態別ヒ素分析法の開発**

無機ヒ素(2種類)と有機ヒ素化合物(6種類)を、汎用的な分析機器である HPLC を用いた ODS カラムによる逆相イオンペアクロマトグラフィーにより分離し、ICP-MS で検出するための測定条件を設定した。今後は、ヒ素含有量の高い食品や摂取量推定に使用する分析用試料(主に、トータルダイエツト試料)からの各種ヒ素化合物の抽出法を検討し、本検討で構築した測定法と併せて、ヒ素の化学形態別分析法を開発する。また、これら試料からのヒ素の化学形態別摂取量推定も検討する予定である。

## **F. 研究発表**

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

菊地博之、渡邊敬浩、赤木浩一、松田りえ子「魚介類中のメチル水銀を対象とした GC-MS 分析法の改良」第 105 回日本食品衛生学会学術講演会(2013).

### 3. その他

表1 試料由来のマトリクスによるメチルフェニル水銀のピーク面積への影響

マトリクス	試料	PEG200の 共注入	ピーク面積			Ave.	SD	RSD(%)
			n=1	n=2	n=3			
無	標準溶液	無	2391	2499	2761	2550	190	7.5
		有	3860	3940	3852	3884	49	1.3
	タラ	無	2321	2225	2163	2236	80	3.6
		有	3402	3471	3425	3433	35	1.0
	メバチマグロ	無	4975	4988	4683	4882	172	3.5
		有	7818	7865	7801	7828	33	0.4
有	サバ	無	2455	3069	2768	2764	307	11
		有	4124	4128	4169	4140	25	0.6
	カツオ	無	2325	2294	2124	2248	108	4.8
		有	3667	3658	3564	3630	57	1.6

マトリクス	試料	ピーク面積の平均値の比 (PEG共注入有/PEG共注入無)
無	標準溶液	1.53
有	タラ	1.54
	メバチマグロ	1.60
	サバ	1.51
	カツオ	1.62

表2 PSA カラム精製によるメチルフェニル水銀のピーク面積への影響

試料	カラム精製	ピーク面積			Ave.	SD	RSD(%)
		n=1	n=2	n=3			
標準溶液	無	1772	1687	1740	1733	43	2.5
	有	1711	1712	1706	1710	3	0.2
タラ	無	1624	1596	1540	1587	43	2.7
	有	1577	1649	1546	1591	53	3.3
メバチマグロ	無	3696	3856	3868	3807	96	2.5
	有	3751	3732	3865	3783	72	1.9
サバ	無	1855	1805	1836	1832	25	1
	有	1825	1813	1855	1831	22	1.2
カツオ	無	1550	1436	1507	1498	58	3.8
	有	1488	1489	1535	1504	27	1.8

試料	ピーク面積の平均値の比 (カラム精製有/カラム精製無)
標準溶液	1.01
タラ	1.00
メバチマグロ	1.01
サバ	1.00
カツオ	1.00

表 3-1 改良メチル水銀分析法(GC-MS 法)の性能評価結果(認証標準試料)

(a) 国立医薬品食品衛生研究所 1

試料	認証値 (mg/kg)		定量値(mg/kg)					平均値 (mg/kg)	真度* (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
			1st	2nd	3rd	4th	5th				
CRM 7402-a (タラ魚肉粉末)	0.58 ± 0.02 (as Hg)	Portion 1	0.53	0.48	0.50	0.51	0.50	0.50	87	0.8	3.9
		Portion 2	0.53	0.48	0.50	0.51	0.51				
BCR-463 (マグロ魚肉粉末)	3.04 ± 0.16 (as MeHg)	Portion 1	3.08	2.95	3.03	3.09	3.00	2.98	98	4.6	4.6
		Portion 2	3.06	3.14	2.90	2.91	2.68				
ERM-CE464 (マグロ魚肉粉末)	5.50 ± 0.17 (as MeHg)	Portion 1	5.43	6.03	5.08	4.94	5.32	5.23	95	6.0	6.5
		Portion 2	5.32	5.09	4.87	4.98	5.20				
CRM 7403-a (メカジキ魚肉粉末)	5.00 ± 0.22 (as Hg)	Portion 1	4.56	4.62	4.42	4.46	4.43	4.62	92	6.0	6.0
		Portion 2	5.30	4.50	4.85	4.48	4.58				

\*真度は認証値を真値として推定した。

(b) 国立医薬品食品衛生研究所 2

試料	認証値 (mg/kg)		定量値(mg/kg)					平均値 (mg/kg)	真度* (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
			1st	2nd	3rd	4th	5th				
CRM 7402-a (タラ魚肉粉末)	0.58 ± 0.02 (as Hg)	Portion 1	0.57	0.54	0.55	0.51	0.53	0.54	94	1.4	4.3
		Portion 2	0.58	0.56	0.56	0.52	0.53				
BCR-463 (マグロ魚肉粉末)	3.04 ± 0.16 (as MeHg)	Portion 1	3.00	2.90	2.84	2.92	2.86	2.94	97	3.0	3.0
		Portion 2	2.91	3.08	2.86	3.06	3.01				
ERM-CE464 (マグロ魚肉粉末)	5.50 ± 0.17 (as MeHg)	Portion 1	5.33	5.29	4.83	5.15	5.37	5.25	95	2.6	3.8
		Portion 2	5.46	5.15	5.09	5.44	5.35				
CRM 7403-a (メカジキ魚肉粉末)	5.00 ± 0.22 (as Hg)	Portion 1	4.75	4.72	4.70	4.78	4.84	4.75	95	0.9	1.6
		Portion 2	4.82	4.69	4.62	4.72	4.86				

\*真度は認証値を真値として推定した。

(c) 福岡市保健環境研究所

試料	認証値 (mg/kg)		定量値(mg/kg)					平均値 (mg/kg)	真度* (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
			1st	2nd	3rd	4th	5th				
CRM 7402-a (タラ魚肉粉末)	0.58 ± 0.02 (as Hg)	Portion 1	0.52	0.48	0.52	0.44	0.44	0.49	85	5.5	7.3
		Portion 2	0.50	0.51	0.54	0.46	0.52				
BCR-463 (マグロ魚肉粉末)	3.04 ± 0.16 (as MeHg)	Portion 1	2.96	2.75	2.79	2.74	2.68	2.80	92	6.7	6.8
		Portion 2	2.70	2.66	2.86	3.26	2.61				
ERM-CE464 (マグロ魚肉粉末)	5.50 ± 0.17 (as MeHg)	Portion 1	5.61	4.81	4.74	5.09	4.66	5.01	91	3.6	6.1
		Portion 2	5.34	4.85	5.18	4.99	4.87				
CRM 7403-a (メカジキ魚肉粉末)	5.00 ± 0.22 (as Hg)	Portion 1	5.18	4.19	4.33	4.76	4.41	4.48	90	4.9	6.9
		Portion 2	4.60	4.23	4.29	4.37	4.42				

\*真度は認証値を真値として推定した。

表 3-2 改良メチル水銀分析法(GC-MS 法)の性能評価結果(添加試料)

(a) 国立医薬品食品衛生研究所 1

試料	添加濃度 (mg/kg)		定量値*(mg/kg)					平均値 (mg/kg)	真度(%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
			1st	2nd	3rd	4th	5th				
タラ	0	Portion 1	0.08	0.07	0.08	0.07	0.09	0.08	-	-	-
		Portion 2	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09				
	0.3	Portion 1	0.24	0.26	0.27	0.28	0.27	0.27	89	1.2	5.0
		Portion 2	0.25	0.26	0.28	0.28	0.27				
キハダマグロ	0	Portion 1	0.09	0.11	0.10	0.09	0.10	0.10	-	-	-
		Portion 2	0.09	0.09	0.09	0.10	0.11				
	0.3	Portion 1	0.26	0.26	0.24	0.24	0.29	0.27	88	6.7	8.1
		Portion 2	0.26	0.28	0.29	0.25	0.29				

\*添加試料の定量値は、ブランク試料の全定量値の平均値を差し引いた値として示した。

(b) 国立医薬品食品衛生研究所 2

試料	添加濃度 (mg/kg)		定量値*(mg/kg)					平均値 (mg/kg)	真度(%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
			1st	2nd	3rd	4th	5th				
タラ	0	Portion 1	0.09	0.09	0.09	0.10	0.09	0.09	-	-	-
		Portion 2	0.09	0.09	0.09	0.10	0.09				
	0.3	Portion 1	0.30	0.29	0.28	0.28	0.29	0.29	95	4.4	4.4
		Portion 2	0.28	0.29	0.27	0.31	0.27				
キハダマグロ	0	Portion 1	0.11	0.11	0.10	0.13	0.10	0.11	-	-	-
		Portion 2	0.11	0.11	0.11	0.12	0.12				
	0.3	Portion 1	0.27	0.33	0.27	0.32	0.31	0.29	98	6.3	7.6
		Portion 2	0.30	0.30	0.27	0.29	0.30				

\*添加試料の定量値は、ブランク試料の全定量値の平均値を差し引いた値として示した。

表 4 SRM 測定における最適なコリジョンエネルギーの検討

プリカーサーイオン(m/z)	コリジョンエネルギー(V)	プロダクトイオン(m/z 277)の強度
292	5	$4.9 \times 10^4$
	10	$3.3 \times 10^4$
	15	$8.0 \times 10^3$
	20	$3.8 \times 10^3$
プリカーサーイオン(m/z)	コリジョンエネルギー(V)	プロダクトイオン(m/z 279)の強度
294	5	$1.0 \times 10^5$
	10	$5.4 \times 10^4$
	15	$7.7 \times 10^3$
	20	$4.9 \times 10^3$

表5 各濃度の検量線用測定溶液のから得られた SN 比と戻しバイアス

メチル水銀濃度 (ng/mL)	SN比				
	測定1	測定2	測定3	測定4	測定5
0.1	169	46	23	17	10
0.5	618	560	226	1359	370
1	821	1531	290	685	656
2.5	1105	2564	1887	1552	2834
5	1435	2368	3835	4937	4240

メチル水銀濃度 (ng/mL)	戻しバイアス(%)				
	測定1	測定2	測定3	測定4	測定5
0.1	75	-24	48	28	57
0.5	-14	-9.6	0.1	-10	6.8
1	-2.9	10	-7.8	2.5	-14
2.5	0.9	-1.2	1.2	0.0	1.8
5	0.7	-1.8	-0.4	1.6	0.1

表6 メチル水銀分析法(GC-MSM/MS 法)の真度および併行精度の推定結果(n=4)

SEMP試料	添加濃度 (mg/kg)	定量値* (mg/kg)				平均値 (mg/kg)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)
		n=1	n=2	n=3	n=4			
10群	0	0.029	0.028	0.025	0.028	0.027	-	-
	0.05	0.041	0.045	0.041	0.040	0.042	84	4.9
11群	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-	-
	0.005	0.0051	0.0047	0.0048	0.0048	0.0048	97	3.3

\*添加試料の定量値は、ブランク試料の全定量値の平均値を差し引いた値として示した。

表7 HPLC による測定の初期条件

HPLC条件
カラム: CAPCELL PAK C18MG (資生堂社製) (内径4.6 mm 長さ25 cm 粒子径5 μm)
移動相: 0.05 % メタノール 10 mM 1-ブタンスルホン酸ナトリウム 4 mM TMAH 4 mM マロン酸 溶液(pH3)
流速: 0.75 mL/min
カラム温度: 25
注入量: 20 μL

表8 検討した HPLC カラムの種類

カラム	サイズ
1 CAPCELL PAK C18MG (資生堂社製)	内径4.6 mm 長さ15 cm 粒子径3 μm
2 Inerisil AS (GL-Science社製)	内径2.1 mm 長さ25 cm 粒子径3 μm
3 Inert Sustain (GL-Science社製)	内径4.6 mm 長さ25 cm 粒子径3 μm
4 Mightysil RP-18 GP (関東化学社製)	内径4.6 mm 長さ25 cm 粒子径3 μm
5 L-column2 (化学物質研究評価機構社製)	内径4.6 mm 長さ25 cm 粒子径3 μm

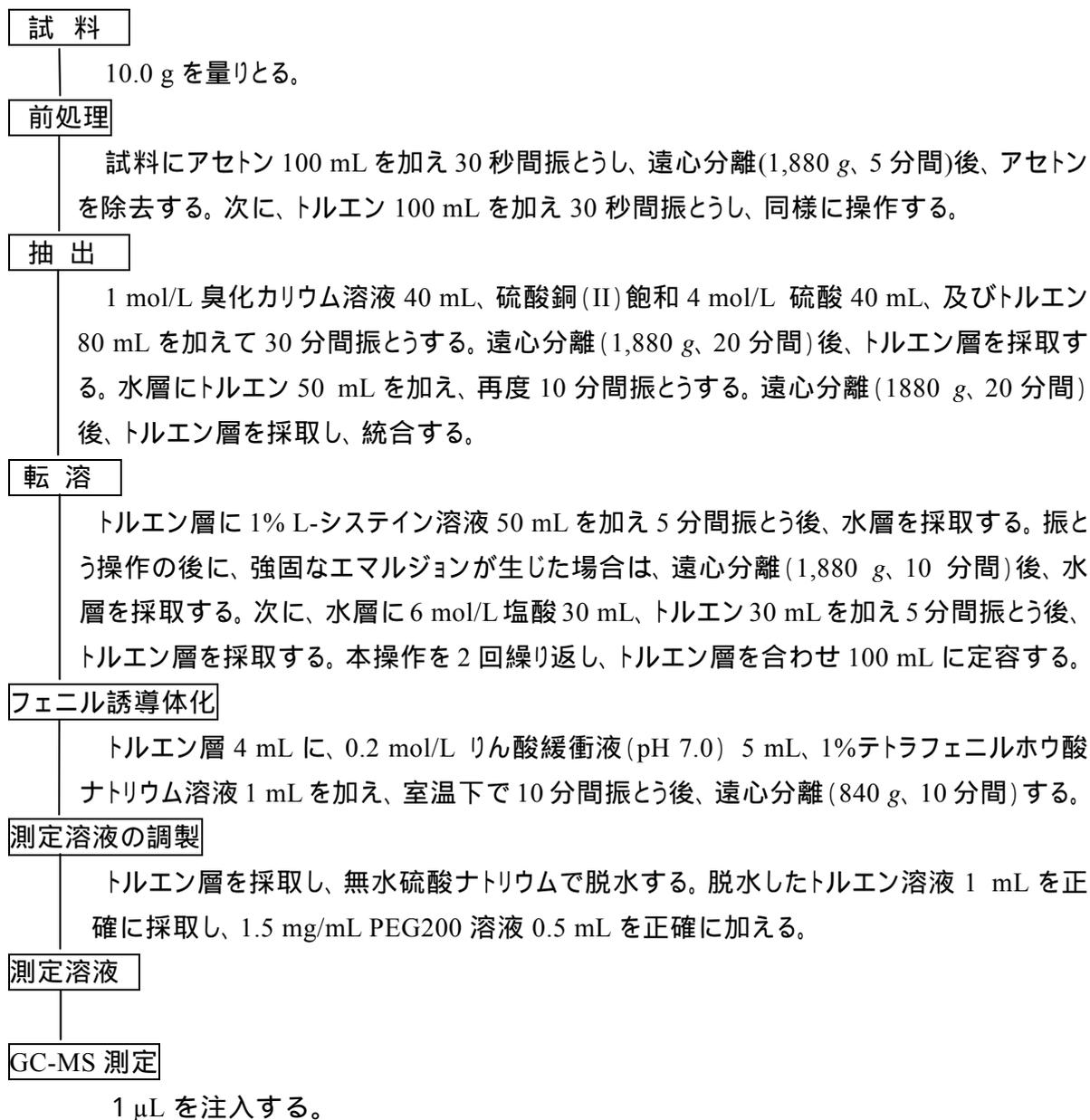


図 1 改良 GC-MS 法のフローチャート

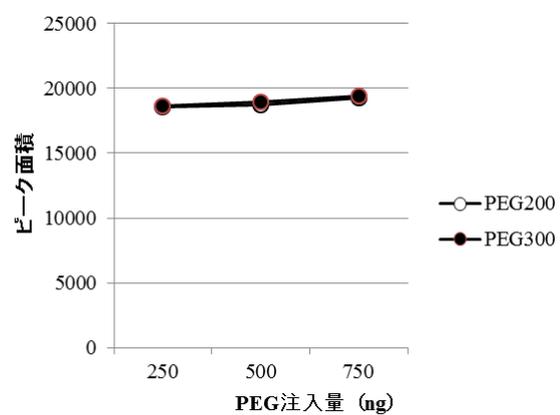
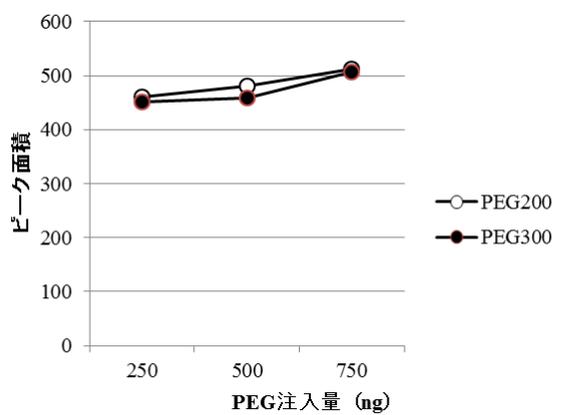


図 2-1 PEG の共注入量によるメチルフェニル水銀のピーク面積への影響

左図：2.5 ng/mL のメチルフェニル水銀溶液、右図：100 ng/mL のメチルフェニル水銀溶液

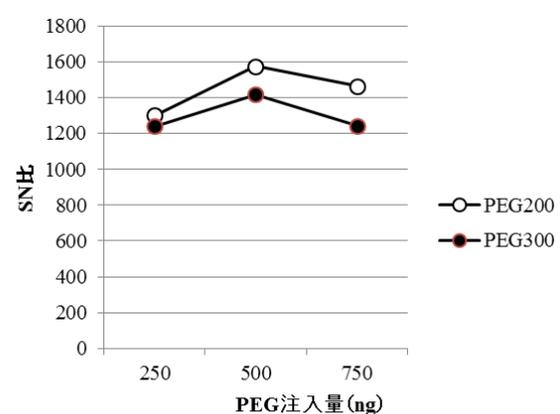
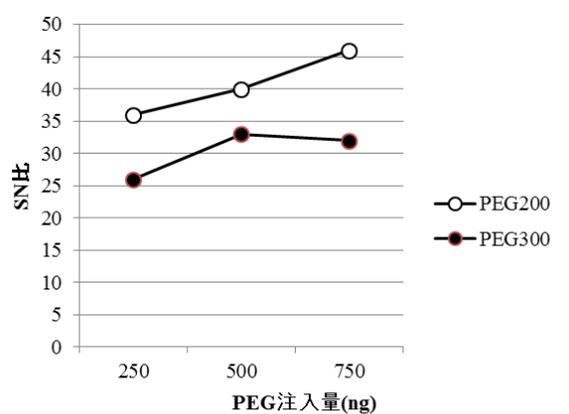
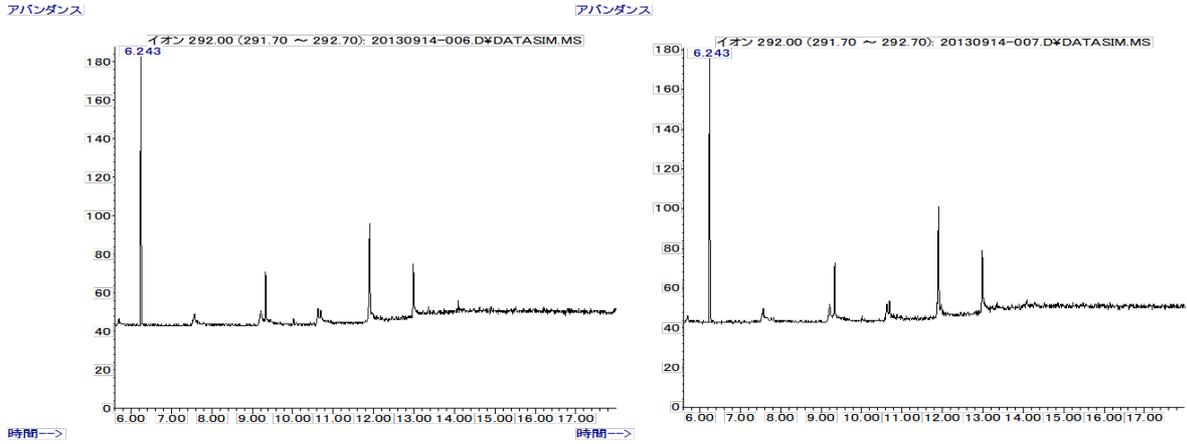


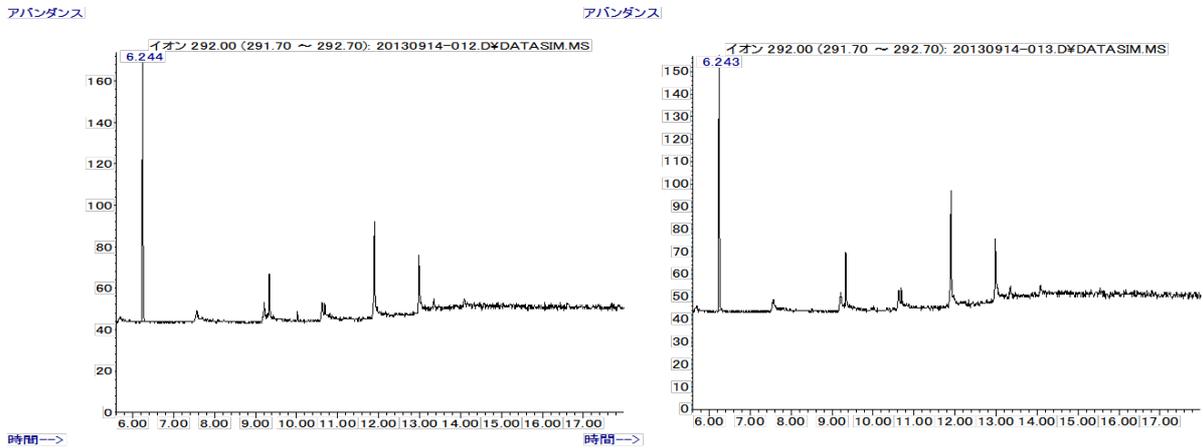
図 2-2 PEG の共注入量によるメチルフェニル水銀の SN 比への影響

左図：2.5 ng/mL のメチルフェニル水銀溶液、右図：100 ng/mL のメチルフェニル水銀溶液

(a) 試料：メチル水銀標準溶液



(b) 試料：タラ



(c) 試料：メバチマグロ

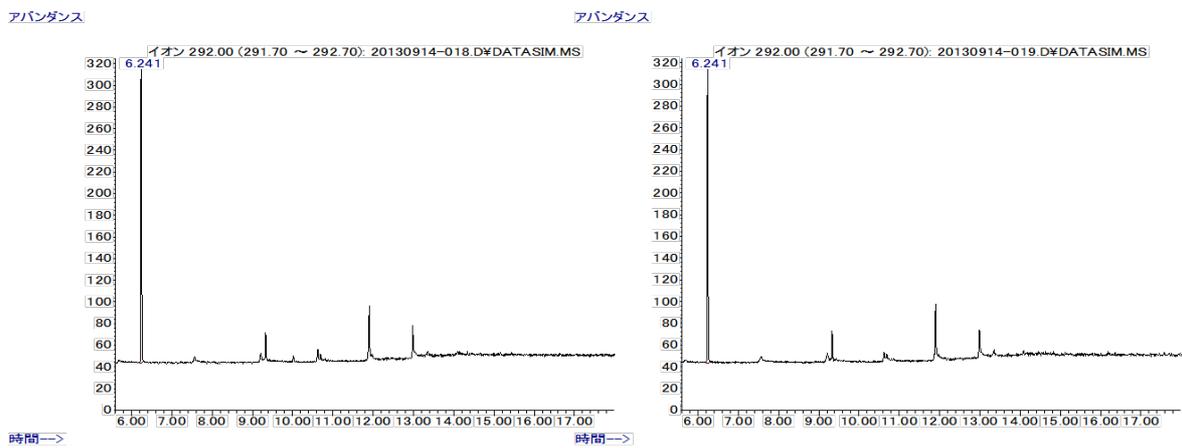
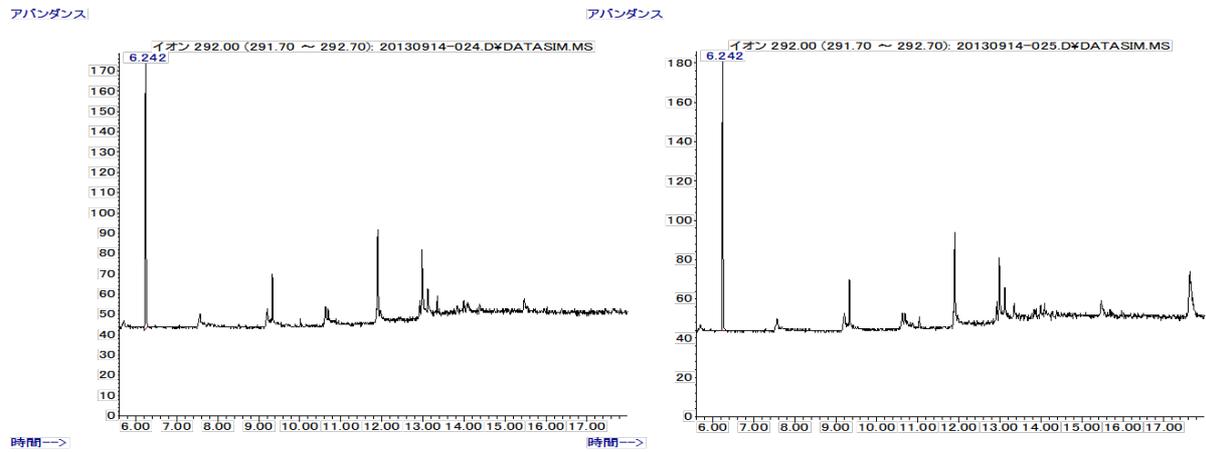


図3 PSA カラム精製によるクロマトグラムへの影響

左図：PSA カラム精製無、右図：PSA カラム精製有

(d) 試料：サバ



(e) 試料：カツオ

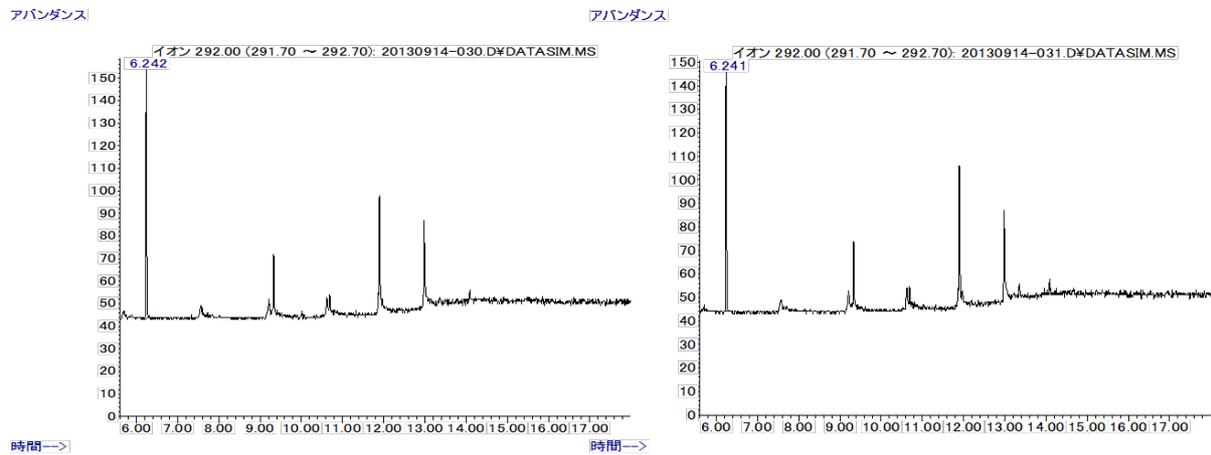


図3 PSA カラム精製によるクロマトグラムへの影響(続き)

左図：PSA カラム精製無、右図：PSA カラム精製有

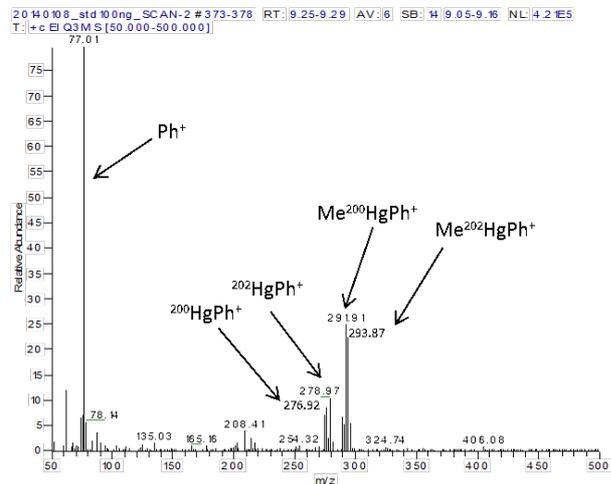
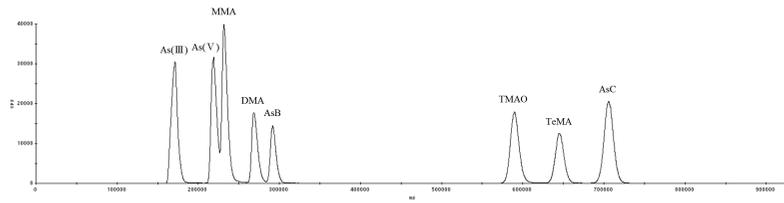
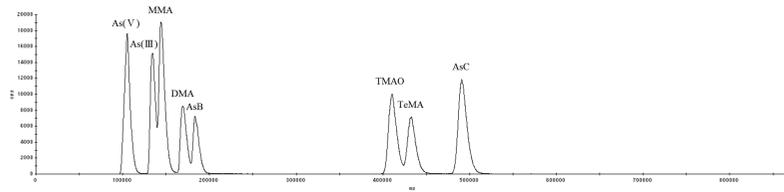


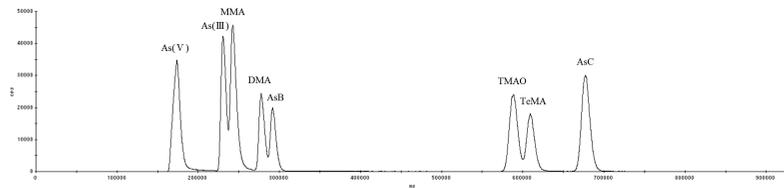
図4 メチルフェニル水銀のマススペクトル



(a)



(c)



(e)

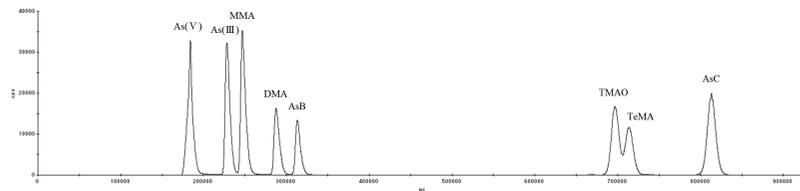
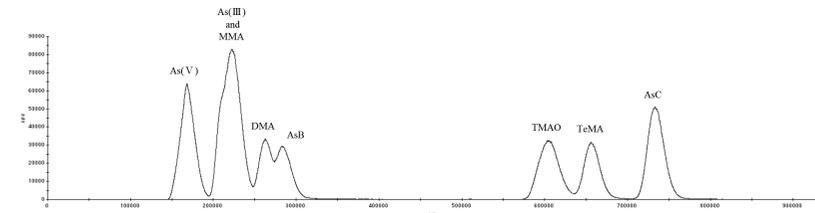


図 5-1 初期条件における化学形態別ヒ素の測定

(HPLC カラム: CAPCELL PAK C18 MG; 内径 4.6 mm 長さ 25 cm 粒子径 5  $\mu\text{m}$ )

(b)



(d)

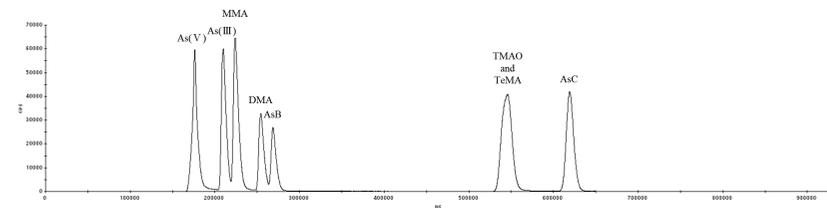


図 5-2 HPLC カラムの検討

(a) CAPCELL PAK C18MG (内径 4.6 mm 長さ 15 cm 粒子径 3  $\mu\text{m}$ )

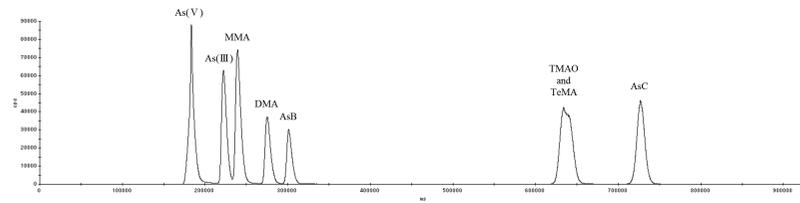
(b) Inerisil AS (内径 2.1 mm 長さ 25 cm 粒子径 3  $\mu\text{m}$ )

(c) Inert Sustain (内径 4.6 mm 長さ 25 cm 粒子径 3  $\mu\text{m}$ )

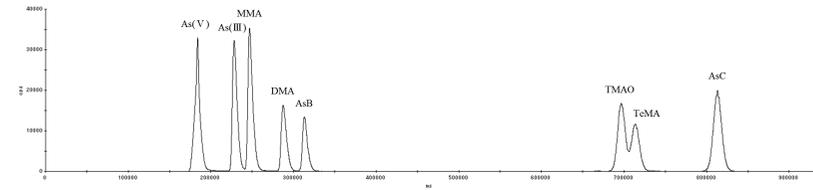
(d) Mightysil RP-18 GP (内径 4.6 mm 長さ 25 cm 粒子径 3  $\mu\text{m}$ )

(e) 化学物質研究評価機構 L-column2 (内径 4.6 mm 長さ 25 cm 粒子径 3  $\mu\text{m}$ )

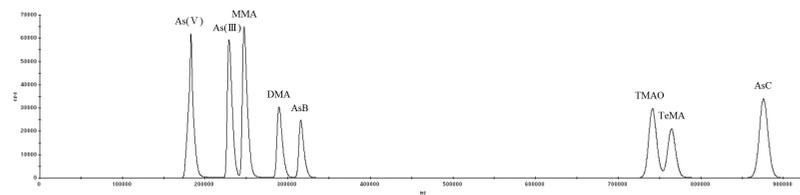
(a)



(b)



(c)



(d)

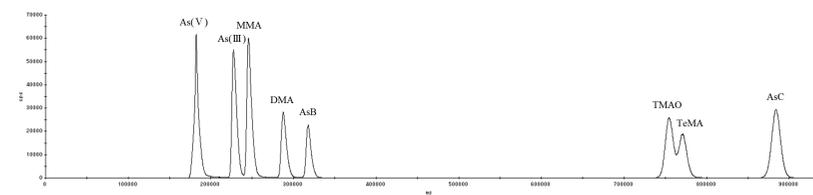
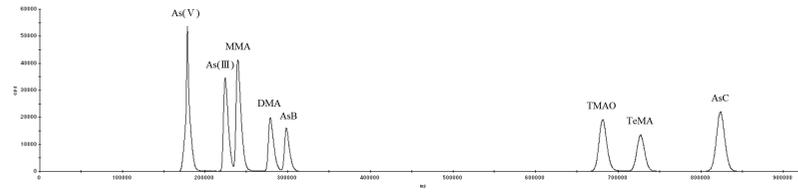


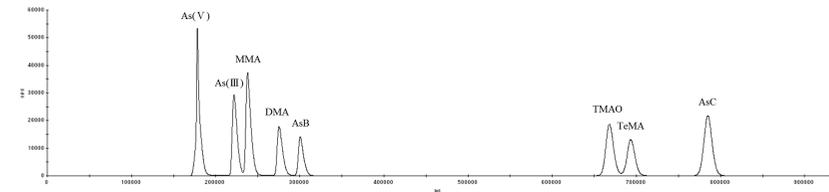
図 6-1 1-ブタンスルホン酸ナトリウム濃度の検討

(a) 8 mM (b) 10 mM (初期条件) (c) 12 mM (d) 14 mM

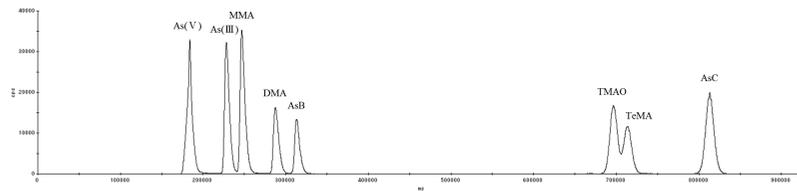
(a)



(b)



(c)



(d)

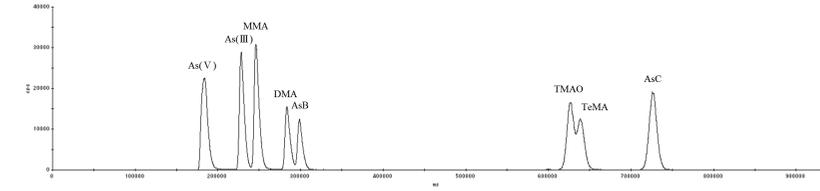
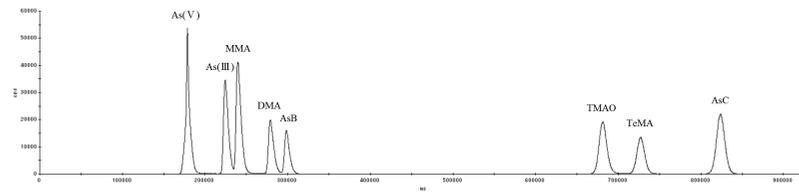


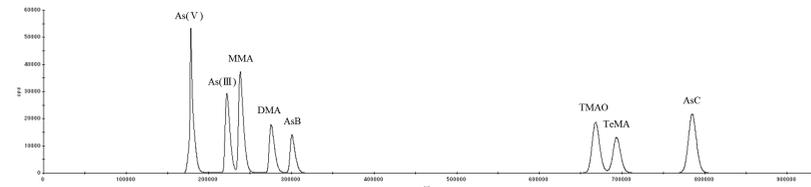
図 6-2 TMAH 濃度の検討

(a) 1 mM (b) 2 mM (c) 4 mM (初期条件) (d) 8 mM

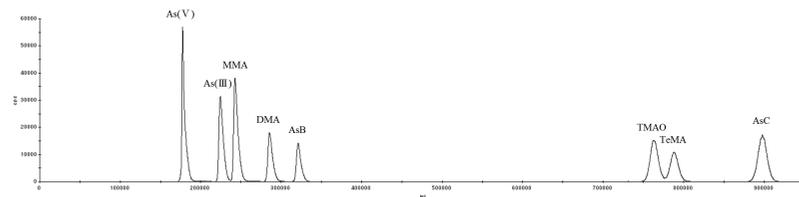
(a)



(b)



(c)



(d)

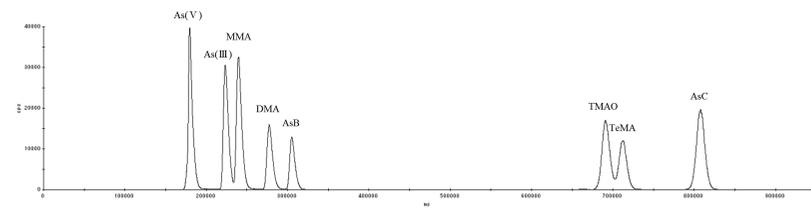


図 6-3 1-ブタンサルホン酸ナトリウムおよび TMAH 濃度の検討

(a) 1-ブタンサルホン酸ナトリウム 10 mM、TMAH 1 mM

(b) 1-ブタンサルホン酸ナトリウム 10 mM、TMAH 2 mM

(c) 1-ブタンサルホン酸ナトリウム 12 mM、TMAH 1 mM

(d) 1-ブタンサルホン酸ナトリウム 12 mM、TMAH 2 mM