

なお、内部標準法による分析の報告<sup>1)</sup>もあるが、本検討で用いた測定条件では分析カラムへの内部標準物質として用いる元素の保持が弱かったため、内部標準法は用いなかった。

### 検出限界(LOD)及び定量下限(LOQ)の推定

標準溶液を順次希釈して、信号が認められた最小の濃度(0.1 ng/mL)を繰り返し 11 回測定し、分析値の標準偏差( $\sigma$ )の 3 倍の値( $3\sigma$ )を LOD、10 倍の値( $10\sigma$ )を LOQ とし、それぞれ推定した。

### 精米及び玄米を分析対象とした無機ヒ素分析法の性能を評価するための実験計画

精米、または玄米を基材とする認証標準試料、及び As(III)と As(V)の標準溶液を用いて調製した添加試料(精米及び玄米)を下記のとおり計画的に分析することで評価した。

#### 1) 認証標準試料の分析

白米粉末(NMIJ CRM 7503-a)、玄米粉末(NMIJ CRM 7532-a)を 5 併行で分析し、認証値と比較した。また、その時の併行精度及び、認証値を真値として真度を推定した。

#### 2) 添加試料の分析

購入した玄米 30 試料をそれぞれ粉碎することで調製した試料を分析法に従い予備的に分析した。その結果から、As(III)の濃度が 0.02 mg/kg 未満、As(V)の濃度が 0.005 mg/kg 未満であることを確認した試

料より 1 つを選び、玄米のブランク試料とした。これをとう精した試料を精米のブランク試料とした。

予備的に分析した精米試料及び玄米試料に含まれる As(III)と As(V)の濃度を踏まえ、添加濃度を決定し、標準品をブランク試料に添加した試料(添加試料)を計画的に分析することで、分析法の性能を評価した。ブランク試料と添加試料を 5 併行で分析し、添加試料から得られた分析値から、ブランク試料の分析結果(n=5)の平均値を差し引いた後、真度と併行精度を推定した。

添加濃度は、精米試料、玄米試料ともに、低濃度添加では、As(III) 0.05mg/kg、As(V) 0.01mg/kg とし、高濃度添加では、As(III) 0.15mg/kg、As(V) 0.05mg/kg とした。高濃度添加における添加濃度は、Codex 委員会で採択された精米の無機ヒ素の最大基準値が 0.2 mg/kg であることから、As(III)と As(V)の濃度の和が 0.2 mg/kg となり、かつ文献<sup>1-12)</sup>の実態調査の情報等も踏まえ、より実態に近い As(III)と As(V)の濃度として、As(III) 0.15mg/kg、As(V) 0.05mg/kg を選択した。

低濃度添加試料は、As(III)の添加用標準溶液 A を正確に 0.5 mL、As(V)の添加用標準溶液 C を正確に 1 mL 加え、よく混合して調製した。高濃度添加試料は、As(III)の添加用標準溶液 A を正確に 1.5 mL、As(V)の添加用標準溶液 B を正確に 0.5 mL 加え、よく混合して調製した。

## 検討 2) LC-MS/MS 等を用いた無機ヒ素及び有機ヒ素化合物の化学形態別分析法の開発

### 分析対象化合物

昨年度の報告では、LC-MS/MS では無機ヒ素の検出が困難であるために有機ヒ素化合物 6 種類を対象としたが、本年度は無機ヒ素 2 種類についても検討を行った。

有機ヒ素化合物：①MMA、②DMA、③トリメチルアルシンオキシド(TMAO)、④AsB、⑤アルセノコリン(AsC)、⑥テトラメチルアルソニウム(TeMA)

無機ヒ素：①As(III)、②As(V)

### 試料

下記の認証標準試料を使用した。

タラ：タラ魚肉粉末；NMIJ CRM 7402-a (産業技術総合研究所製) (AsB 認証値：As として  $35.5 \pm 1.8$  mg/kg)

メカジキ：メカジキ魚肉粉末；NMIJ CRM 7403-a (産業技術総合研究所製) (AsB 認証値：As として  $6.23 \pm 0.21$  mg/kg)

コメ：白米粉末；NMIJ CRM 7503-a (産業技術総合研究所製) (DMA 認証値：As として  $0.0133 \pm 0.009$  mg/kg、As(III)認証値：As として  $0.0711 \pm 0.029$  mg/kg、As(V)認証値：As として  $0.0130 \pm 0.009$  mg/kg)

### 試薬等

硝酸(比重:1.38、濃度:60～61%)は関東化学社製を用いた。ギ酸は関東化学社製を用いた。

水：ADVANTEC 社製装置(ULTRAPURE WATER SYSTEM)により製造した超純水(比抵抗  $> 18.2 \text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 、TOC  $< 1$  ppb)を用いた。

標準品：下記の 8 種類を使用した。

MMA、DMA、AsB、AsC は、和光純薬工業社製、TMAO、TeMA はトリケミカル研究所社製、As(III)は関東化学製、As(V)は産業技術総合研究所製を用いた。

HPLC 用移動相：0.1%ギ酸水溶液は、水にギ酸 1mL を混和し、水で 1L とした。0.1%ギ酸アセトニトリル溶液は、アセトニトリルにギ酸 1mL を混和し、アセトニトリルで 1L とした。

### 分析機器

LC-MS/MS：アジレントテクノロジー社製 1200 シリーズおよび ABSCIEX 社製 4000QTrap を用いた。

LC-QTOF/MS：アジレントテクノロジー社製 1200 シリーズおよびアジレントテクノロジー社製 6530 を用いた。

### LC-MS/MS 測定条件

HPLC 条件を昨年度報告分から変更したことで、測定時間が短縮し、より一般的なギ酸アセトニトリル系移動相の使用が可能となった。

### HPLC 条件

カラム：CR1:50 (内径 2 mm 長さ 15 cm) (資生堂社製)

移動相：A 液：0.1%ギ酸水溶液/B 液：0.1%ギ酸アセトニトリル溶液

グラジエント条件：表 1

流速：0.2 mL/min

カラム温度：40℃

オートサンプラー温度：4℃

注入量：1 μL

測定時間：15 min

### MS/MS 条件

イオン化法：ESI

イオン化モード：ポジティブモード(有機ヒ素)、ネガティブモード(無機ヒ素)

イオン源のパラメータを表 2、各分析対象化合物の測定条件を表 3 に示した。

### LC-QTOF/MS 測定条件

#### HPLC 条件

カラム：Atrantis T3 (内径 2 mm 長さ 5 cm、3 μm) (Waters 社製)

移動相：A 液：0.1%ギ酸水溶液/B 液：0.1%ギ酸アセトニトリル溶液(A : B = 99 : 1)

流速：0.1 mL/min(アイソクラティック)

カラム温度：40℃

オートサンプラー温度：4℃

注入量：5 μL

測定時間：5 min

#### QTOF/MS 条件

イオン化法：ESI

イオン化モード：ポジティブモード(有機ヒ素)、ネガティブモード(無機ヒ素)

#### 測定溶液の調製

認証標準試料を検討 1)と同様に操作し、

測定溶液とした。試料採取量、及び測定直前の希釈倍率を適宜変更して検討した。

### 検量線の作成

各標準原液を適宜量りとり、表 4 の濃度となるよう水で希釈して混合標準液を調製し、上記測定条件にて測定して得られたピーク面積値の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。

### **C.D. 研究結果及び考察**

#### 検討 1) 精米及び玄米を分析対象とした無機ヒ素分析法の開発

分析対象を精米及び玄米に限定することから、含有されるヒ素化合物に限られると推測されるため、分析時間の短縮とクロマトグラムにおけるピークの形状や分離の改善を目的に測定条件の最適化を検討した。

分析に供する試料量についても、試料の性質上、精米及び玄米はトータルダイエツト試料よりも As(III)と As(V)の濃度が高いことが推測されるため、試料量の変更を検討した。

#### **C.D. 1-1 分析時間の検討**

米に含まれるヒ素化合物は、無機ヒ素の As(III)、As(V)と有機ヒ素化合物の MMA、DMA が大部分であることが報告されている<sup>1-12)</sup>。また、海外の文献では AsB も検出されるといった報告もある<sup>13-14)</sup>。そこで、検出される可能性のある有機ヒ素化合物の

保持時間も考慮して、分析時間の短縮を検討した。昨年度までに開発した HPLC-ICP-MS 法では、As(V)、As(III)、MMA、DMA、AsB の順でクロマトグラムにピークが検出される。最後に検出される AsB の保持時間が約 5 分であることを考慮し、測定時間をこれまでの 15 分から 7 分に短縮した。

#### C.D. 1-2 クロマトグラムにおけるピーク形状改善の検討

昨年度までに開発した HPLC-ICP-MS 法では、マトリクスが多い試料溶液を測定した後に標準溶液を測定すると、ピークのテーリングやピーク形状が悪くなる現象が As(V) で顕著に観察された(図 1)。この現象の解消を目的に文献を調査した結果、移動相にリン酸二水素アンモニウムを添加することで、ピーク形状が改善される可能性が高いことが判明した<sup>15)</sup>。そこで、文献を参考にリン酸二水素アンモニウムの添加について検討した。なお、リン酸二水素アンモニウムの添加により As(V) のピークの形状が改善される理由としては、As(V) の酸解離定数(pKa 2.2)が、リン酸の酸解離定数(pKa 2.1)に近いこと、分析カラムへのリン酸と As(V) の相互作用によるクロマトグラフィーへの効果が大きいことと考えられる。

最初にリン酸二水素アンモニウムの添加濃度を検討した。文献ではその濃度を 5 mM としているが、5 mM よりも濃度を低くするとピーク形状の改善と分離に明確な効果がなかった。反対に、5 mM よりも濃度を高くすると、5 mM の時と同程度のピ

ーク形状の改善とピーク分離が得られた。しかし、ICP-MS のサンプルコーンとスキマーコーンへの汚染が生じ、測定溶液の繰り返し測定を行うに連れて、機器の感度低下が見られた。

以上の結果より、リン酸二水素アンモニウムの添加濃度は、文献と同様に 5 mM とした。

次に、リン酸二水素アンモニウムの添加による移動相の pH を検討した。昨年度までに開発した HPLC-ICP-MS 法では、移動相の pH は 3 としているが、文献ではリン酸二水素アンモニウムを添加した場合の移動相の pH は 2.7 が最適とされている。そこで、pH の違いによるクロマトグラムにおけるピークの形状と分離を比較した(図 2)。その結果、移動相の pH が 3 よりも 2.7 の方が As(V) のピークが鋭く、左右の対称性も優れていた。また、As(V) 以外のヒ素化合物についても、隣接するピークの分離がよい結果であった。特に、測定するヒ素化合物の中で最も近接する As(III) と MMA のピーク、及び DMA と AsB のピークの分離については、明確な違いが見られた。

以上の結果より、移動相の pH は、文献と同様に 2.7 とした。これにより、昨年度までに開発した HPLC-ICP-MS 法と比較して、有機ヒ素化合物のピークの妨害なく無機ヒ素のピークを、より選択的に検出することが可能となった。

また、その他観察された現象として、リン酸二水素アンモニウムを移動相に添加することで、添加しない場合の移動相(昨年度

までに開発した HPLC-ICP-MS 法の移動相)と比較して、調製後 24 時間以降に観察されていた白色沈殿が生じなくなった。このため、移動相の用時調製の必要がなく翌日以降の測定にも使用可能であった。

#### C.D. 1-3 分析に供する試料量の検討

精米及び玄米を分析対象とすることから、これらを調理後、調製される 1 群のトータルダイエット試料より、精米及び玄米の方が As(III)と As(V)の濃度は高いことが推測される。この場合、昨年度までに開発した HPLC-ICP-MS 法の分析手順、検出限界と定量下限の推定値(表 5)、及び検量線の濃度範囲を考慮すると、試料量を減らすことが可能である。そこで、これまでに報告のある精米及び玄米における As(III)と As(V)濃度の文献情報<sup>1-12)</sup>も併せて検討し、分析に供する試料量をこれまでの 2.0 g から 1.0 g に変更した。

#### C.D. 1-4 精米及び玄米を分析対象とした無機ヒ素分析法の性能評価

C.D.1-1~1-3 に示した検討の結果、最終的に規定した無機ヒ素分析法(改良 HPLC-ICP-MS 法)(図 3)について、その妥当性を評価した。

##### 1) 認証標準試料の分析結果

白米粉末(NMIJ CRM 7503-a)から得られた分析値の解析結果に基づき推定された真度、併行精度を表 6 に示した。As(III)は、真度 77%、併行精度(RSD%) 1.1%と推定さ

れ、As(V)は、真度 226%、併行精度(RSD%) 1.0%と推定された。As(III)の真度が低く、As(V)の真度が高く推定されたことは、分析操作の際に As(III)から As(V)へと価数の変換が起こったためと考えられた。そのため認証値の不確かさの範囲内で As(III)と As(V)を個別に定量することはできなかった。

しかし、As(III)と As(V)の認証値の和を真値とし、これと As(III)と As(V)分析値の和との比較から推定した真度は 100%、併行精度(RSD%)は 1.0%であった。この場合は、As(III)の認証値と As(V)の認証値の和の合成標準不確かさの範囲内での分析が可能であった。

玄米粉末(NMIJ CRM 7532-a)から得られた分析値の解析結果に基づき推定された真度、併行精度を表 7 に示した。真度は 99%、併行精度(RSD%)は 1.6%と推定された。また、認証値の不確かさの範囲内での分析が可能であった。

##### 2) 添加試料の分析結果

各試料を 5 点併行で分析し、分析値の解析結果に基づき推定された真度と併行精度を表 8、表 9 に示した。

精米では各添加濃度の As(III)及び As(V)の組み合わせを通じて、As(III)の真度は 112~102%、As(V)の真度は 71~100%と推定された。併行精度(RSD%)は 0.8~3.9%と推定された。

玄米では各添加濃度の As(III)及び As(V)の組み合わせを通じて、As(III)の真度は 98

～100%、As(V)の真度は 105～109%と推定された。併行精度(RSD%)は 1.8～2.6%と推定された。

また、精米及び玄米を通じ、As(III)とAs(V)の添加量の和を真値とし、これとAs(III)とAs(V)分析値の和との比較から推定した真度は 100～102%、併行精度(RSD%)は 1.5～2.6%であった。

以上の結果より、認証標準試料、添加試料によらず、無機ヒ素量としての真度は 99～102%、併行精度(RSD%)は 1.0～2.6%と推定された。したがって、As(III)とAs(V)の量の和を無機ヒ素量として定量可能な分析法であると評価し、精米及び玄米に適用可能であると判断した。

## 検討 2) LC-MS/MS 等を用いた無機ヒ素及び有機ヒ素化合物の化学形態別分析法の開発

### **C.D. 2-1 認証標準試料による真度確認**

各有機ヒ素化合物の標準溶液を前述の測定条件により測定し、検量線の直線性を確認したところ、AsBは0.001～0.2 µg/mL、他の化合物は 0.001～0.5 µg/mL において良好な直線性があった(図 4)。R<sup>2</sup> 値としては、0.98 以上、AsB を除くと 0.99 以上であった。検量線の最低濃度を定量下限濃度とし、試料濃度換算したものを暫定定量下限値として表 10 に示した。

設定した LC-MS/MS 測定条件、検量線範囲、暫定定量下限値に基づき、測定溶液として調製した認証標準試料タラ、メカジキ、コメを、希釈倍率を段階的に変更して n=1

で測定し、認証値との比較による真度確認を行った。また、空試験についても同様に操作した。

当初は試料量を 2.0 g としたが、水分不足により抽出操作時に均質化しなかったため、暫定定量下限値以上の測定値が見込まれるタラとメカジキの有機ヒ素化合物について、試料量を 0.20 g に変更して操作した。その際、測定溶液の発泡が見られたため、タンパク質除去を目的に測定直前に限外ろ過(分子量 3000 以上排除)を行った試料についても別途測定した。各条件にて測定した結果を表 11 に示した。また、図 5 に認証標準試料のクロマトグラムの例を示した。

試料採取量 2.0 g の場合、コメの DMA、As(III)、As(V)はいずれも暫定定量下限値未満であり、定量値を得ることはできなかった。タラ及びメカジキの AsB は検出されたが、希釈倍率によって定量値が大きく異なり、マトリクス成分の影響が強く見られた。認証値と比較した真度としては、10 倍希釈液でタラ、メカジキいずれも 40%程度であった。

試料採取量 0.20 g の場合、10 倍希釈液でタラが 64%、メカジキが 51%と真度が向上し、抽出の改善が見られた。限外ろ過の有無では真度に大きな変化は見られず、タンパク質以外のマトリクス成分が定量に影響を与えている可能性が高いと考えられる。

なお、認証値のない化合物では、MMA がタラ、メカジキ、コメから、TeMA がタラから、As(III)がタラ、メカジキから検出された。

### C.D. 2-2 測定溶液のマトリクス影響確認

測定溶液中のマトリクス成分が測定に与える影響を確認するために、2.0 g の試料を操作した測定溶液を C.D.2-1 と同様の倍率で段階的に希釈したものに、0.5 µg/mL (試料由来濃度を除く) となるよう混合標準液を添加して測定し、測定濃度と添加濃度の比を求めた(表 12)。

空試験では、試料抽出液由来のマトリクスの影響が認められたが、10 倍以上に希釈することで影響はほぼ無くなった。

認証標準試料についても、希釈倍率が高いほどマトリクスの影響が低減する傾向が見られた。また、化合物ごとに定量に必要な希釈倍率が異なることが示唆され、定量下限値を考慮して希釈倍率を決定する必要があることを確認した。

### C.D. 2-3 認証標準試料への添加回収試験

タラ、メカジキについて、試料 0.20 g に対し、有機ヒ素 6 種混合標準液 4 µg を添加し、回収試験を行った。回収率を表 13 に示した。

認証標準試料への添加試験では、MMA、TeMA の回収率は概ね良好であったが、その他の化合物については抽出条件や希釈倍率等についてさらに検討する必要がある。

### C.D. 2-4 測定イオン形態の確認

LC-MS/MS 条件で設定した各測定対象化合物の  $m/z$  について、イオン形態を確認するために、LC-QTOF/MS で標準品の精密質量測定を行った。表 14 に LC-MS/MS 条件

の Q1 及び Q3 として推定されるイオン形態と LC-MS/MS 設定  $m/z$ 、理論精密  $m/z$ 、QTOF 測定精密  $m/z$  を挙げ、 $m/z$  の理論値と QTOF 測定値のずれを示した。有機ヒ素化合物 6 種については、すべて数 ppm のずれであり、想定しているイオン形態であることが強く推定された。無機ヒ素については LC-MS/MS で測定している  $m/z$  が検出されなかったが、ESI のイオン化条件が LC-MS/MS と LC-QTOF/MS で異なるためと考えられる。

また、無機ヒ素 2 種をポジティブモードで測定したところ、標準品由来と推測されるピークが検出された(表 15、図 6)。何らかのイオン付加体と考えられるが、形態の特定にはさらに検討が必要である。無機ヒ素をポジティブモードで測定することができれば、有機ヒ素化合物とあわせて 8 種を同時測定することが可能となる。

## E. 結論

### 研究 1: 精米及び玄米を分析対象とした無機ヒ素分析法の開発

昨年度までに開発した HPLC-ICP-MS 法の分析対象を精米及び玄米に特化させ、より選択的に無機ヒ素を分析可能とする分析法に改良した。改良 HPLC-ICP-MS 法の性能を評価し、価数の変換が生じたことが原因で As(III)と As(V)を独立して定量するには十分な性能を確認できない場合があったが、As(III)と As(V)の量の和を無機ヒ素量とすれば、十分な性能で分析できることを確認した。以上より、改良 HPLC-ICP-MS

法は精米及び玄米を分析する性能を有すると判断した。

今後は、全国で流通する精米及び玄米に含まれる無機ヒ素濃度の実態を調査する予定である。

## 検討 2) LC-MS/MS 等を用いた無機ヒ素及び有機ヒ素化合物の化学形態別分析法の開発

LC-MS/MS による、6 種の有機ヒ素化合物の測定条件を変更して 2 種の無機ヒ素についても対応し、検量線濃度範囲を決定して暫定定量下限値を定めた。認証標準試料を測定したところ、測定溶液を 10 倍希釈することで抽出液由来のマトリクス成分の影響なく測定できるようになり、希釈倍率をさらに高くすることで試料由来のマトリクス成分の影響を低減することができた。希釈倍率を上げることで定量下限値が高くなることになるが、必要とする精度を考慮して条件を設定することで、実試料において LC-MS/MS で有機ヒ素化合物 6 種及び無機ヒ素 2 種を測定することができることを確認した。

また、LC-QTOF/MS で標準品の精密質量測定を行い、有機ヒ素のイオン形態を確認した。今後は、測定条件のさらなる改良を行い、認証標準品や添加回収試験により性能を評価する予定である。

## F. 参考文献

- 1) Nishimura, T., Nagaoka, H, M., Sakakibara, N., Abe, T., Maekawa, Y., &

- Maitani, T. (2010). 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(4), 178-181.
- 2) Narukawa, T., Inagaki, K., Kuroiwa, T., & Chiba, K. (2008). The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC-ICP-MS. *Talanta*, 77(1), 427-432.
- 3) Heitkemper, D. T., Kubachka, K. M., Halpin, P. R., Allen, M. N., & Shockey, N. V. (2009). Survey of total arsenic and arsenic speciation in US-produced rice as a reference point for evaluating change and future trends. *Food Additives and Contaminants*, 2(2), 112-120.
- 4) Narukawa, T., & Chiba, K. (2010). Heat-assisted aqueous extraction of rice flour for arsenic speciation analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(14), 8183-8188.
- 5) Narukawa, T., Hioki, A., & Chiba, K. (2012). Speciation and monitoring test for inorganic arsenic in white rice flour. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(4), 1122-1127.
- 6) Huang, J. H., Fecher, P., Ilgen, G., Hu, K. N., & Yang, J. (2012). Speciation of arsenite and arsenate in rice grain—Verification of nitric acid based extraction method and mass sample survey. *Food chemistry*, 130(2), 453-459.

- 7) Raber, G., Stock, N., Hanel, P., Murko, M., Navratilova, J., & Francesconi, K. A. (2012). An improved HPLC–ICPMS method for determining inorganic arsenic in food: application to rice, wheat and tuna fish. *Food chemistry*, 134(1), 524-532.
- 8) Narukawa, T., Suzuki, T., Inagaki, K., & Hioki, A. (2014). Extraction techniques for arsenic species in rice flour and their speciation by HPLC–ICP-MS. *Talanta*, 130, 213-220.
- 9) Narukawa, T., Matsumoto, E., Nishimura, T., & Hioki, A. (2014). Determination of sixteen elements and arsenic species in brown, polished and milled rice. *Analytical Sciences*, 30(2), 245-250.
- 10) Ukena, T., Matsumoto, E., Nishimura, T., Harn, J. C. S., Lee, C. N. A., Rojanapantip, L., Mayteeyonpiriya, N., Suthilucksanavanish, K., & Yamada, Y. (2014). Speciation and determination of inorganic arsenic in rice using liquid chromatography-inductively coupled plasma/mass spectrometry: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 97(3), 946-955.
- 11) Naito, S., Matsumoto, E., Shindoh, K., & Nishimura, T. (2015). Effects of polishing, cooking, and storing on total arsenic and arsenic species concentrations in rice cultivated in Japan. *Food chemistry*, 168, 294-301.
- 12) Signes-Pastor, A. J., Carey, M., Carbonell-Barrachina, A. A., Moreno-Jiménez, E., Green, A. J., & Meharg, A. A. (2016). Geographical variation in inorganic arsenic in paddy field samples and commercial rice from the Iberian Peninsula. *Food chemistry*, 202, 356-363.
- 13) Pizarro, I., Gómez, M., Palacios, M. A., & Cámara, C. (2003). Evaluation of stability of arsenic species in rice. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 376(1), 102-109.
- 14) Mihucz, V. G., Virág, I., Zang, C., Jao, Y., & Zárny, G. (2007). Arsenic removal from rice by washing and cooking with water. *Food Chemistry*, 105(4), 1718-1725.
- 15) Narukawa, T., Matsumoto, E., Nishimura, T., & Hioki, A. (2015). Reversed phase column HPLC-ICP-MS conditions for arsenic speciation analysis of rice flour. *Analytical Sciences*, 31(6), 521-527.

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし
3. その他

表1 LC-MS/MS法のグラジエント条件

時間(min)	A	B
0.00	1	99
0.50	1	99
3.00	99	1
13.00	99	1
13.01	1	99
23.00	1	99

表2 イオン源のパラメータ

(a) ポジティブモード

CUR	CAD	IS	TEM	GS1	GS2
(psi)	(-)	(V)	(°C)	(psi)	(psi)
10	8	5500	700	40	70

(b) ネガティブモード

CUR	CAD	IS	TEM	GS1	GS2
(psi)	(-)	(V)	(°C)	(psi)	(psi)
50	8	-4500	700	50	60

CUR: Curtain Gas      GS1: Ion Source Gas1  
 GS2: Ion Source Gas2    IS: Ion Spray Voltage  
 TEM: Temperature      CAD: Collision Gas

表 3 分析対象化合物の測定条件

分析対象化合物	Q1 ( <i>m/z</i> )	Q3 ( <i>m/z</i> )		DP (V)	CE (eV)
		定量	確認		
MMA	141.1	90.9	92.8	46	31
DMA	139.1	120.9	90.8	46	19
TMAO	137.1	121.9	107.1	66	25
TeMA	135.1	119.8	105.0	61	25
AsB	179.2	120.0	105.1	66	29
AsC	165.2	120.8	105.1	66	25
As(III)	106.9	106.9	90.9	-90	-30
As(V)	140.9	107.0	122.9	-25	-50

表 4 LC-MS/MS 法の検量線の設計

分析対象化合物	濃度( $\mu\text{g/mL}$ )					
	std1	std2	std3	std4	std5	std6
MMA	0.001	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5
DMA	0.001	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5
TMAO	0.001	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5
TeMA	0.001	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5
AsB	0.001	0.01	0.05	0.1	0.2	-
AsC	0.001	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5
As(III)	0.001	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5
As(V)	0.001	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5

表 5 HPLC-ICP-MS 法の LOD 及び LOQ の推定値

分析対象化合物	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
As(V)	0.00022	0.00073
As(III)	0.00016	0.00053

表 6 改良 HPLC-ICP-MS 法の性能評価結果(認証標準試料；精米)

分析対象化合物	認証値(mg/kg) (as As)		定量値(mg/kg) (as As)					平均値 (mg/kg)	真度 <sup>※1</sup> (%)	併行精度 (RSD%)
			n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			
As(III)	0.0711	± 0.0029	0.0550	0.0543	0.0556	0.0540	0.0547	0.0547	77	1.1
As(V)	0.0130	± 0.0009	0.0297	0.0289	0.0296	0.0293	0.0295	0.0294	226	1.0
As(III)+As(V)	0.0841	± 0.0030 <sup>※2</sup>	0.0847	0.0832	0.0852	0.0833	0.0843	0.0841	100	1.0

※1 真度は認証値を真値として推定した。  
 ※2 As(III)とAs(V)の認証値より算出した。

表 7 改良 HPLC-ICP-MS 法の性能評価結果(認証標準試料；玄米)

分析対象化合物	認証値(mg/kg) (as As)		定量値(mg/kg) (as As)					平均値 (mg/kg)	真度 <sup>※1</sup> (%)	併行精度 (RSD%)
			n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			
As(III)+As(V)	0.298	± 0.008	0.293	0.291	0.298	0.290	0.301	0.295	99	1.6

※1 真度は認証値を真値として推定した。

表 8 改良 HPLC-ICP-MS 法の性能評価結果(添加試料；精米)

(a) 低濃度添加

分析対象化合物	添加濃度 (mg/kg)		定量値(mg/kg) <sup>*</sup>					平均値 (mg/kg)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)
			n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			
As(III)	0.05	ブランク試料	0.016	0.016	0.016	0.015	0.016	0.016		-
		添加試料	0.051	0.052	0.049	0.052	0.052	0.051	102	2.9
As(V)	0.01	ブランク試料	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		-
		添加試料	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	100	0.8
As(III)+As(V)	0.06		0.061	0.062	0.058	0.062	0.062	0.061	102	2.6

※添加試料の定量値は、ブランク試料の全平均値を差し引いて示した。

(b) 高濃度添加

分析対象化合物	添加濃度 (mg/kg)		定量値(mg/kg) <sup>*</sup>					平均値 (mg/kg)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)
			n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			
As(III)	0.15	ブランク試料	0.016	0.016	0.016	0.015	0.016	0.016		-
		添加試料	0.168	0.163	0.169	0.173	0.169	0.168	112	2.2
As(V)	0.05	ブランク試料	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		-
		添加試料	0.035	0.033	0.036	0.037	0.036	0.035	71	3.9
As(III)+As(V)	0.2		0.204	0.196	0.205	0.210	0.205	0.204	102	2.5

※添加試料の定量値は、ブランク試料の全平均値を差し引いて示した。

表9 改良 HPLC-ICP-MS 法の性能評価結果(添加試料；玄米)

(a) 低濃度添加

分析対象化合物	添加濃度 (mg/kg)		定量値(mg/kg) <sup>※</sup>					平均値 (mg/kg)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)
			n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			
As(III)	0.05	ブランク試料	0.028	0.026	0.026	0.027	0.026	0.027		-
		添加試料	0.048	0.051	0.049	0.048	0.050	0.049	98	2.6
As(V)	0.01	ブランク試料	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002		-
		添加試料	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	109	1.8
As(III)+As(V)	0.06		0.059	0.061	0.060	0.059	0.061	0.060	100	1.9

※添加試料の定量値は、ブランク試料の全平均値を差し引いて示した。

(b) 高濃度添加

分析対象化合物	添加濃度 (mg/kg)		定量値(mg/kg) <sup>※</sup>					平均値 (mg/kg)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)
			n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			
As(III)	0.15	ブランク試料	0.028	0.026	0.026	0.027	0.026	0.027		-
		添加試料	0.153	0.150	0.152	0.147	0.146	0.150	100	2.2
As(V)	0.05	ブランク試料	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002		-
		添加試料	0.053	0.053	0.051	0.054	0.052	0.053	105	1.8
As(III)+As(V)	0.2		0.206	0.203	0.203	0.200	0.198	0.202	101	1.5

※添加試料の定量値は、ブランク試料の全平均値を差し引いて示した。

表 10 LC-MS/MS 法の暫定定量下限値の計算

(a) 試料採取量 2.0g の場合

希釈倍率 (倍)	濃度(g/kg)							
	MMA	DMA	TMAO	TeMA	AsB	AsC	As(III)	As(V)
1	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
2	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
10	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
100	1	1	1	1	1	1	1	1
1000	10	10	10	10	10	10	10	10
10000	100	100	100	100	100	100	100	100

(b) 試料採取量 0.2g の場合

希釈倍率 (倍)	濃度(g/kg)							
	MMA	DMA	TMAO	TeMA	AsB	AsC	As(III)	As(V)
1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
10	1	1	1	1	1	1	1	1
100	10	10	10	10	10	10	10	10
1000	100	100	100	100	100	100	100	100
10000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

表 11 LC-MS/MS 法による認証標準試料の分析結果

(a) 試料採取量 2.0g の場合

試料	希釈倍率 (倍)	定量値(mg/kg) (as As)								真度(%) <sup>※</sup>			
		MMA	DMA	TMAO	TeMA	AsB	AsC	As(III)	As(V)	AsB	DMA	As(III)	As(V)
空試験	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-
	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-
	10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-
	100	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-
	1000	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-
	10000	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-
タラ	1	(-)	(-)	(-)	0.10	0.99	(-)	2.1	(-)	2.8	-	-	-
	2	0.087	(-)	(-)	0.034	0.68	(-)	5.7	(-)	1.9	-	-	-
	10	0.18	(-)	(-)	(-)	14	(-)	7.8	(-)	40	-	-	-
	100	1.2	(-)	(-)	(-)	14	(-)	(-)	(-)	39	-	-	-
	1000	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-
	10000	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-
メカジキ	1	(-)	(-)	(-)	(-)	0.40	(-)	0.50	(-)	6.4	-	-	-
	2	0.14	(-)	(-)	(-)	0.054	(-)	2.0	(-)	0.9	-	-	-
	10	0.30	(-)	(-)	(-)	2.8	(-)	(-)	(-)	44	-	-	-
	100	2.9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-
	1000	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-
	10000	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-
コメ	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	(-)	(-)	(-)
	2	0.065	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	(-)	(-)	(-)
	10	0.25	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	(-)	(-)	(-)
	100	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	(-)	(-)	(-)
	1000	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	(-)	(-)	(-)
	10000	60	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	(-)	(-)	(-)

(-): 暫定定量下限値未満

-: 計算対象外

※真度は認証値を真値として推定した。

表 11 LC-MS/MS 法による認証標準試料の分析結果(続き)

(b) 試料採取量 0.2g の場合

試料	希釈倍率 (倍)	定量値(mg/kg) (as As)						真度(%) <sup>※</sup>
		MMA	DMA	TMAO	TeMA	AsB	AsC	AsB
空試験	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-
	1(限外ろ過)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-
	10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-
タラ	1	(-)	(-)	(-)	0.20	1.7	(-)	4.8
	1(限外ろ過)	0.18	(-)	(-)	0.57	1.1	(-)	3.2
	10	1.6	(-)	(-)	(-)	23	(-)	64
メカジキ	1	(-)	(-)	(-)	(-)	0.12	(-)	2.0
	1(限外ろ過)	0.15	(-)	(-)	(-)	0.39	(-)	6.2
	10	1.4	(-)	(-)	(-)	3.2	(-)	51

(-): 暫定定量下限値未滿

-: 計算対象外

※真度は認証値を真値として推定した。

表 12 試料由来マトリクスによる分析値への影響

試料	希釈倍率 (倍)	添加濃度に対する測定濃度の比(%)							
		MMA	DMA	TMAO	TeMA	AsB	AsC	As(III)	As(V)
空試験	2	81	65	248	135	101	140	76	28
	10	100	94	99	100	98	100	100	88
	100	98	103	97	97	87	96	101	99
	1000	98	101	99	98	88	98	104	99
	10000	98	98	94	93	91	94	102	101
タラ	2	83	14	6	63	5	17	36	60
	10	117	61	31	71	80	63	76	165
	100	127	85	66	83	115	73	102	172
	1000	118	90	92	97	103	94	114	133
	10000	112	78	104	104	101	103	109	116
メカジキ	2	79	20	6.2	81	8.0	40	31	54
	10	120	77	38	76	94	76	79	157
	100	130	101	70	81	100	74	98	185
	1000	116	103	88	93	88	91	104	143
	10000	122	107	94	99	93	102	109	125
コメ	2	75	81	54	105	93	85	0	33
	10	119	122	55	78	103	69	11	86
	100	117	111	87	95	97	94	53	121
	1000	104	104	97	100	92	98	89	124
	10000	106	105	100	102	96	101	100	114

表 13 添加試験の分析結果(試料：認証標準試料)

試料	希釈倍率 (倍)	回収率(%)					
		MMA	DMA	TMAO	TeMA	AsB	AsC
空試験	1	33	24	357	67	8	78
	10	86	99	82	115	112	104
タラ	1	38	8	33	29	5	11
	10	94	126	36	73	234	40
メカジキ	1	41	11	61	37	10	15
	10	78	136	43	87	139	58

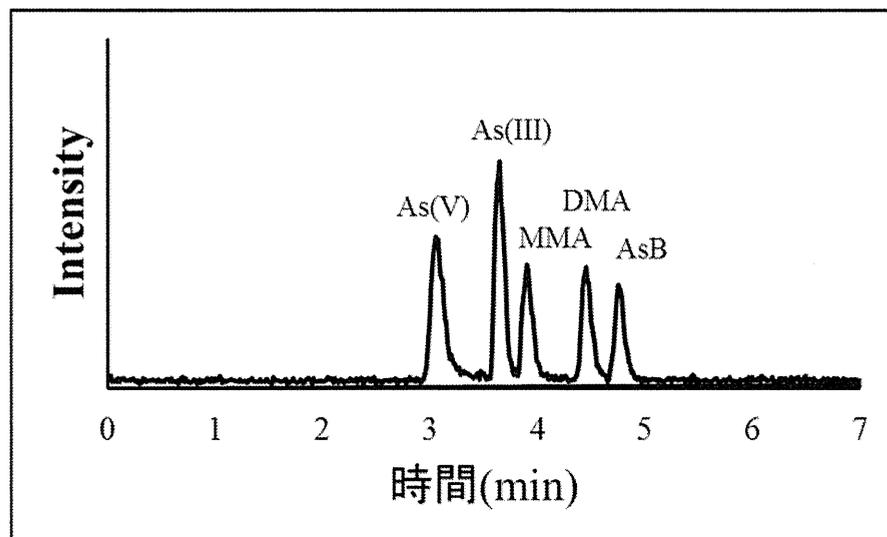
表 14 LC-QTOF/MS による精密質量測定結果(有機ヒ素：ポジティブモード、無機ヒ素：ネガティブモード)

分析対象化合物	Q1測定 イオン	MS/MS Q1 (m/z)	理論 Q1 (m/z)	QTOF Q1 (m/z)	Q1 (m/z) ずれ(ppm) (QTOF測定/理論値)	Q3測定 イオン	MS/MS Q3 (m/z)	理論 Q3 (m/z)	QTOF Q3 (m/z)	Q3 (m/z) 一致率 (QTOF測定/理論値)
MMA	CH <sub>6</sub> AsO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	141.15	140.9533	140.9543	-7.1615	AsO <sup>+</sup>	90.9	90.9165	90.9163	-2.1998
DMA	C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> AsO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	139.13	138.9740	138.9737	2.3458	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> AsO <sup>+</sup>	120.9	120.9635	120.9631	-2.9870
TMAO	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> AsO <sup>+</sup>	137.07	136.9948	136.9944	2.6384	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> AsO <sup>+</sup>	121.9	121.9713	121.9714	0.8199
TeMA	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> As <sup>+</sup>	135.11	135.0155	135.0154	0.7176	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> As <sup>+</sup>	119.8	119.9920	119.9918	-1.6668
AsB	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> AsO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	179.17	179.0053	179.0056	-1.5300	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> As <sup>+</sup>	120.0	119.9920	119.9923	2.5002
AsC	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> AsO <sup>+</sup>	165.15	165.0261	165.0254	4.0089	C <sub>3</sub> H <sub>10</sub> As <sup>+</sup>	120.8	120.9998	120.9993	-4.1322
As(III)	AsO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	106.90	106.9114	-	-	AsO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	106.9	106.9114	-	-
As(V)	H <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	140.90	140.9169	-	-	AsO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	107.0	106.9114	-	-

表 15 LC-QTOF/MS による精密質量測定結果(無機ヒ素：ポジティブモード)

分析対象化合物	QTOF		
	Q1 (m/z)		
As(III)	152.8903	170.9007	216.9225
As(V)	142.9322	236.7568	

(a)



(b)

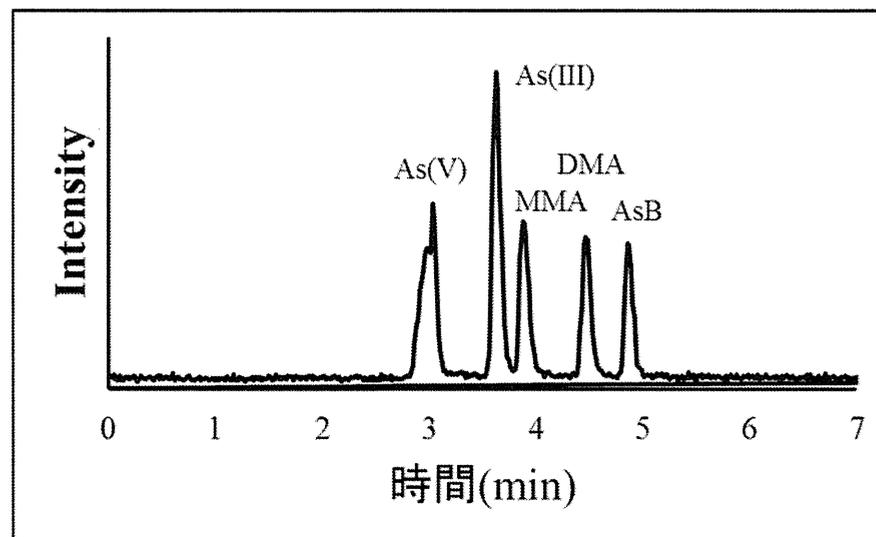


図1 各ヒ素化合物の標準溶液のクロマトグラム(リン酸二水素アンモニウム添加なし)

(a) As(V)のピークのテーリング (b) As(V)のピーク形状の悪化