

図3

of exposure ; MOE)を指標に、対策が必要な物質の優先順位付けをすることが国際機関などで提案されている。

日本ではこれまで、遺伝毒性発がん物質の定量的評価を積極的には行って来ていなかった。このことが東日本大震災による福島原子力発電所事故由来の放射性物質汚染の対応に混乱があった一因でもある。国際的には、遺伝毒性発がん性が否定できない無機ヒ素のリスク評価が大きな話題となっており、主な無機ヒ素の摂取源であるコメの基準が、コーデックスで検討されている。コメを多く食べるために、無機ヒ素暴露量が多い日本人としては、優先順位の高い課題である。

リスク管理

リスク評価の結果から、どのような対策をとるべきかを決定するのは、リスク管理者の仕事である。これは例えば、厚生労働省や農林水産省の担当部局が農作物や食品の規格や基準値を設定して施行するということである。この時はリスク評価結果という科学的根拠のみではなく、費用対効果や実行可能性、政治的状況なども考慮される。しかしそれは水面下での政治的配慮、などというのではなく、何をどう考慮してそうなったか、という説明が求められるし、検討プロセスの透明性も確保されな

ければならない。パブリックコメントの募集や説明会の開催などにより、関係者のコミュニケーションが行わなければならない。

リスクコミュニケーション

図1で示すように、リスクコミュニケーションは、リスク分析全ての過程で、いろいろなところで行われる。注意すべきなのは一方的説明ではなく、双方向のコミュニケーションが求められている、ということである。リスク管理者は、リスク評価者に何を目的としてリスク評価をするのかを伝える必要があるし、リスク評価者は、リスク評価の結果、リスク管理の選択肢として、どのようなものが考えられるか、それぞれのメリットやデメリットは何か、などを明確に伝える必要がある。

そしてもちろん消費者や製造業者にも状況を説明し、意見を聞く必要がある。また、リスクコミュニケーションは、製造業者と消費者の間でも行われるし、製造業者とリスク管理者(行政)の間でも行われる。全ての食品には何らかのリスクがあり、そのリスクをどう受け入れて管理するのかを決めるのは、その国や地域の人たちであって、全世界的に唯一の安全基準のようなものが存在するわけではない。リスクについての理解と選択があって、初めて食品の安全性が確保されていると言えるのである。

表 1

リスクの大きさ (健康被害が出る可能性)	食品関連物質
極めて大きい	いわゆる健康食品(効果をうたったもの)
大きい	いわゆる健康食品 (普通の食品からは摂れない量を含むもの)
普通	一般的食品
小さい	食品添加物や残留農薬の基準値超過
極めて小さい	基準以内の食品添加物や残留農薬

日本において近年話題となった「食の安全」の問題の多くは、実質的な安全上の問題ではなく、リスクコミュニケーションの問題だったと言える。残留農薬の基準値超過や「汚染米」報道、産地偽装、そして中国におけるメラミン汚染ミルクが原因での国内の食品回収のような事例は、実質的な安全上の問題ではない。基準値とは何か、安全に関わらない法律違反をどう扱うか、といったことに対する適切な説明と納得があれば「問題」にはならない。そういう意味でも、リスクコミュニケーションが果たす役割は大きい。

毒性学や環境影響の専門家であっても、一般の人々にリスクとハザードをどう区別して、個々の案件についてリスクの大きさの違いをどれだけ正確に伝えられるか、といった課題に対応する必要がある。図3に、食品のリスクについての一般の人たちのイメージと専門家のイメージの違いを示してみた。最も大きな違いは、食品そのもののリスクを認識しているかどうかという部分で、そこが違えば個別の事象、例えば、食品添加物の安全性についての話だけをしても、納得にはつながらないだろうと考えられる。食品というもののリスクの全体像を如何に伝えられるか、ということが重要であろう。

食品中化学物質のリスクの大きさ

表1に食品中化学物質のリスクの大きさを大雑把にまとめてみた。リスク分析においては、食品中の様々なリスクを同じ手法で、同じ判断基準で評価する。食品の中では圧倒的に食品そのものの占める

量が多いため(つまり暴露量が多い)、残留農薬や食品添加物といった、ごく微量の成分のリスクは事実上問題にならない程度に小さい。逆に普通の食生活では食べられないような量のものを、毎日継続して一定以上の長期間摂ることを薦める「いわゆる健康食品」のようなものはリスクが高いことになる。

なお、いわゆる健康食品の中でも、特定保健用食品として認められてはいないのに、病気の予防や治療などの効果効能を宣伝しているものがあり、それらは厳密には薬事法違反である。これらの製品には、時に違法薬物が混入されていることがあり、特に海外で販売されているものを個人輸入して使うような場合には、極めてリスクが高くなる。世界的には、そのような製品による健康被害は多数報告されている。特に目立つのが精力増強用、減量用、アスリート向け筋肉増強用の製品で、これらについては基本的に購入しないことを薦める。

一般的に、人々が安全性について問題視するような農薬や添加物は、たとえそれが基準値超過と報道されるようなことがあっても、「普通の食品」よりは大幅にリスクは小さい。これは圧倒的に量の違いによる。例えば、残留農薬の一律基準違反という事例では、検出される量は0.01ppmを少し上回ったという程度であり、普通の残留農薬の基準値でも数ppmといった量である。

つまり、食品を1kg食べても数mgである。一方例えば、プロテインパウダーのようなものと数十%、つまり1kg食べたら数百g食べることになる。数mgと数百gでは10万倍も違うのである。この違いがリスクの大きさの違いに反映される。食品だからいくら食べても安全であるとは言えない。

リスク分析は、主に食品安全を担当する行政機関が行っていることが多いが、食品製造業者も自社製品についてのリスク分析を行うのが望ましい。各国の規制機関と同じ判断基準でリスク評価ができていれば、もし新規食品の販売に認可が必要な場合でも迅速に対応できるし、なにより自社製品の安全性確保にとって役に立つ。製品による消費者の健康被害事故を望む製造業者はないと思う。どこにリスクがあり、どこをどう管理すれば、リスクが

下げられるのかを一番良く理解しているべきなのは、製造業者自身である。基準を守っているかどうかだけではなく、リスクの大きさをベースに考えていけば、農薬混入事件のような犯罪の際にそれがどの程度のリスクとなり、消費者の健康被害を防ぐために回収すべきかどうかについても迅速に判断できるだろう。

最後に、ここではごく大まかな説明しかできなかったのので、参考図書を紹介する。

・リスク分析についてさらに詳しく知りたい場合には

Food safety risk analysis : a guide for national food safety authorities WHO/FAO 2006の翻訳書である林裕造監修『食品安全リスク分析(食品安全担当者のためのガイド)』, 日本食品衛生協会発行, 2008年

・食品中化学物質のリスク全体についての解説として

畝山智香子『ほんとうの「食の安全」を考える—ゼロリスクという幻想』(DOJIN選書28), 化学同人, 2009年

・特に放射線を含む遺伝毒性発がん物質のリスクについて

畝山智香子『「安全な食べもの」ってなんだろう? 放射線と食品のリスクを考える』, 日本評論社, 2011年

参考文献

- 1) WHO
About risk analysis in food
<http://www.who.int/foodsafety/micro/riskanalysis/en/>
- 2) ILSI Europe Concise Monograph Series 翻訳版
「毒性学的懸念の閾値 (TTC) 食事に低レベルで存在する毒性未知物質の評価ツール」
- 3) 食品安全委員会
食品からのカドミウム摂取の現状に係る安全性確保について」に係る食品健康影響評価の通知文書および評価書
<http://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-tuuchi-cadmium200703.pdf>
- 4) European Food Safety Authority
Cadmium in food - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain
Published: 20 March 2009
http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902396126.htm

Ⅱ. 寄稿『食の安心・安全と機能に関する情報』

1. 10年間の食品安全情報で収集した「いわゆる健康食品」についての海外情報の傾向について

敵山 智香子・登田 美桜

(国立医薬品食品衛生研究所安全情報部)

1. 食品安全情報

国立医薬品食品衛生研究所安全情報部では2003年4月から、海外の食品安全に関する情報をまとめた「食品安全情報」を2週間に1回、発行している¹⁾。このたび10周年を迎え、この間収集した「いわゆる健康食品」についての情報をまとめたので紹介する。

2. いわゆる健康食品の情報について

食品安全情報で取り上げた情報のうち、公的機関の発表したもののみを集計した。言語は主に英語であり、複数の国から同じものについての情報が発表されることがあるため重複が含まれる。また収集対象としている規制機関（たとえばFDAなど）の情報を完全に網羅しているわけでもない。集計結果は合計851件だった。発信国別では米国が30%、カナダ22%、英国11%、韓国10%、香港9%、オーストラリア6%、シンガポール3%、その他9%であった。年次推移については図1に示す。2010年以降の件数の増加は主に米国によるもので、米国FDAがダイエタリーサプリメントにCGMPを義務化したためCGMP違反での警告が増えたこととFDAが監視を強化したことが背景にある。実際に違反や健康被害が増えている可能性も否定はできない。

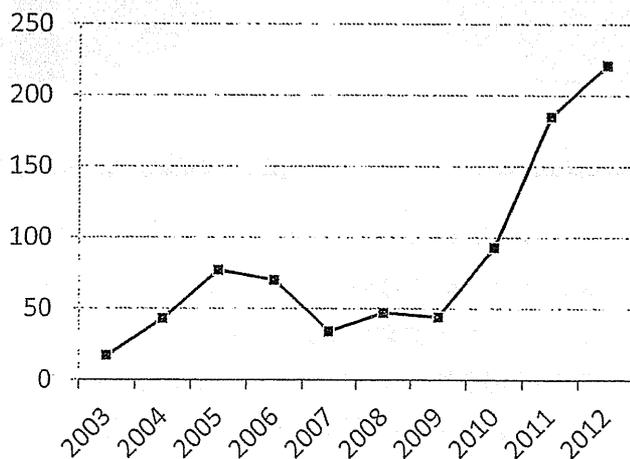


図1 記事件数の年次変化

図2には記事の内容についての内訳を示す。健康被害や医薬品成分あるいは類似化合物などの安全とはみなされない成分が検出された、重金属等の不純物が安全でない量検出されたといった安全性について問題があるとされたものが3/4を占める。表示や宣伝は主に根拠のない、あるいは虚偽の効果効能宣伝・表示による。安全上の問題があるとされた製品の使用目的別の内訳は図3に示す。多いのは性機能増強用・減量用・筋肉増強用の製品である。性機能増強用製品は処方薬成分やその類似物質が含まれることが多い。医薬品として販売されている模造品も多く、検査

を逃れるために少しだけ構造を変えた類似化合物が無数に合成されている。さらにカプセル剤の場合内容物ではなくカプセルのほうに違法薬物成分を含ませたり、といった高度な偽装が行われている事例も報告されており、取り締まりは極めて困難である。減量用製品には下剤や副作用のために使用禁止になった医薬品成分が含まれることが多々ある。この二つの分類の「いわゆる健康食品」については、減量用と宣伝している製品に性機能増強用のシルデナフィル類似物質が含まれたり、性機能増強用製品に食欲抑制剤が検出されたりすることもある。筋肉増強用製品は主にアスリートやボディビルダー向けに出回っていて、タンパク同化ステロイドを含む場合が多い。これらの製品はそれと知らずにアスリートが使用した場合、ドーピング検査陽性となってスポーツ競技での出場停止や失格などのペナルティを受けることになるので注意が必要である。一般の消費者に対しては、これらの効能を示唆するような製品には一切手を出さないように、というのが現在考えられる唯一の対処法である。

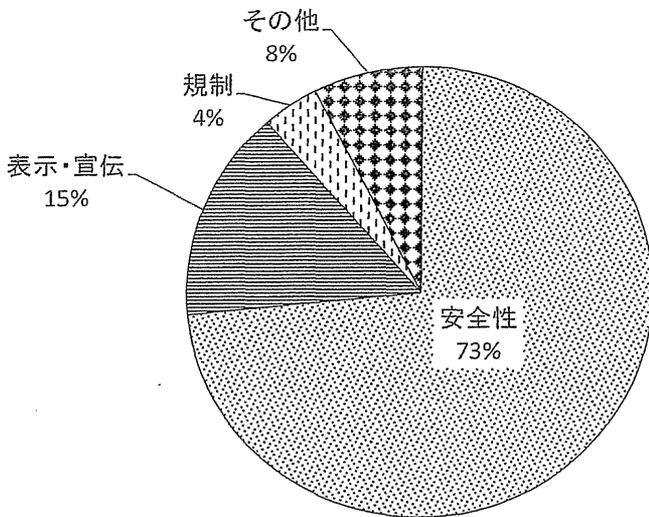


図2 内容別分類 (合計831件)

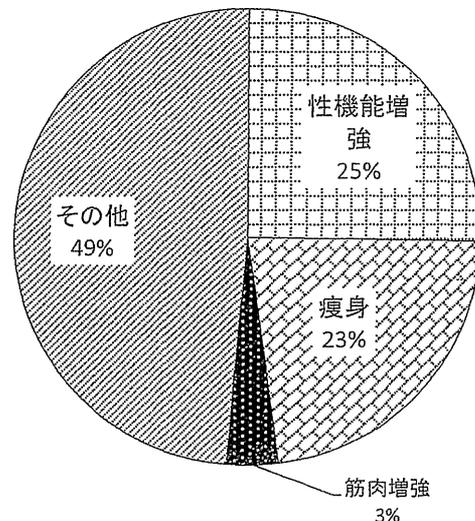


図3 用途別分類 (安全性関連記事610件中)

表1はこれまで死亡事例との関連が報告された成分についてまとめたものである。また表2には複数国で警告や回収などの対応がとられた事例についてまとめた。様々な製品や成分が回収や警告対象になっている。日本では「いわゆる健康食品」であるが、国により「伝統医薬品やハーブ」「ナチュラルヘルス製品」など別の分類になる場合もあり、規制も異なるためリスクの大きさや対処法は個々の事例によるが、このような製品が国際的に流通している。ただ問題となるほとんどの製品は、病気の治療や予防効果を謳ったもので、日本の場合薬事法を厳密に適用すれば全て違法になる製品である。食品は「くすり」ではない、あるいは食べて痩せるようなものはそもそも食品とは言えないだろうという常識的な判断ができれば健康被害は避けられるだろうと思われる。やや例外的なものとして、香港や韓国でもともと中国由来の伝統的医薬品、日本ではいわゆる漢方薬として宣伝・販売されているものに、ステロイド等の合成医薬品が入っていたり有毒植物が間違っ使用されたりという事例が報告されている。日本で局方に定めている「漢方薬」や医師が処方する保険のきく「漢方薬」については医薬品としての安全基準があるが、そうでない中国伝統薬、韓国伝統薬のようなものがいわゆる「漢方」として販売されている場合がある。これ

らは区分上食品になるが、天然由来だからあるいは伝統薬だから安全というわけではない。香港や台湾、中国ではこれらの国が医薬品として認めている製品であってもしばしば異物混入や健康被害が報告されていることは知っておいたほうがよいだろう。

表1 死亡事例で検出された主な物質等

健康被害	主な検出物質
肝臓障害	ブラックコホシュ(植物)、ニメスリド
循環器障害	エフェドリンアルカロイド、シネフリン、シブトラミン、1,3-ジメチルアミルアミン(DMAA)
低血糖	グリベンクラミド
その他 (複数症状等)	デキサメタゾン、ジクロフェナックナトリウム、メカルバモール、フェニルブタゾン、クロルフェニラミン、フェンフルラミン、プロプラノロール

記事数:17件
(報告機関が異なるが内容の重複はあり、因果関係が確立されていないものも含む)

表2 複数国で対応がとられた主な事例

分類	検出物質/植物/製品	含有製品の用途	健康被害
合成物質	シルデナフィル及びその類似化合物	性機能増強	循環器障害
	シブトラミン	痩身	循環器障害
	グリベンクラミド	性機能増強 中国伝統医薬品	低血糖
	1,3-ジメチルアミルアミン(DMAA)	痩身、筋肉増強、興奮作用	循環器、神経障害他
植物 (活性成分)	エフェドラ(成分:エフェドリンアルカロイド)	痩身、興奮作用	循環器障害
	ビターオレンジ(成分:シネフリン)	痩身	循環器障害
	コンフリー(成分:ピロリジジアルカロイド)	健康増進	肝臓障害
	カバカバ(成分:カバラクトン)	不眠改善、鎮静	肝臓障害
	シキミ(成分:アニサチン)	(スターアニスへの混入)	神経障害
	ウマノスズクサ科植物(成分:アリストロキア酸)	痩身、中国伝統医薬品	腎臓障害
	ブラックコホシュ	更年期障害緩和	肝臓障害
	ビターアプリコットカーネル (成分:青酸配糖体アミグダリン)	抗癌作用	シアン化物中毒
製品	「ハイドロキシカット」(成分不明)	痩身	肝臓障害
	「ミラクルミネラル」(成分:亜塩素酸ナトリウム)	様々な疾患治療	消化器、呼吸器障害他
	カフェイン高含有エネルギードリンク	覚醒作用	興奮、不眠、(多量飲酒)

3. 健康食品管理士に向けて

食品安全情報では国内の事例については収集していないが、海外で販売されているいわゆる健康食品を個人輸入したことによる国内での健康被害も報告されている。

直近の例では、2013年10月に米国政府がハワイ州を中心にOxyElite Proという製品に関連して死亡を含む肝臓害の報告が数十例あるという発表を行い、これを受けて日本の厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課から「健康食品(OxyElite Pro)に関する注意喚起について」という

事務連絡が出されている²⁾。ところが2013年12月に、問題の製品を個人輸入した友人から購入して10～11月に約1か月間使用したという20代女性が肝障害で入院したという情報が寄せられ、再度注意喚起を行った³⁾。問題なのは、この被害者が製品を使用していたのは米国で多数の健康被害が報告されて注意喚起された後のことだということである。2013年10月の最初の国内での注意喚起の前には、大手インターネット通販サイトでこの製品の販売が確認されたが、通知により大手サイトは販売ページを削除した。しかし小規模サイトや個人レベルまでは対応されていない。さらに2014年1月にも30代女性がこの製品を使用したことによる健康被害の可能性が報告された。この事例については川越市が医薬品成分であるヨヒンピンを検出したことから、行政上の管轄が食品ではなく医薬品になり、通知は厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課から出されている⁴⁾。OxyElite Proはもともとラベルにヨヒンピンを含む植物であるヨヒンベを含むという記載があり、製品としては先の事例と同じである。日本では本来ヨヒンベを含む製品は健康食品として販売されてはならないのであるが、国によっては食品として扱われている。ただ個人輸入についてはいずれにせよ消費者の自己責任であり、監視や規制の対象外である。

このような事例は氷山の一角であり、実際には報告されない健康被害はたくさんあるだろうと考えられる。問題は消費者がそのようなリスクを承知した上で使用しているとは考えられないということである。いわゆる健康食品は多数販売されているがその宣伝内容は効果効能を誇張しリスクについてはほとんど開示されていない場合が圧倒的である。消費者も提示されていない情報があるということについては知るきっかけすらないのが現状だろう。特に外国語が苦手な人が「健康食品」を輸入代行業者などを介して海外から個人輸入して使用する場合には、外国語で記載されている注意事項や海外での警告などを知らないまま使用する可能性が高い。特に効果・効能を期待して使う場合には違法薬物が含まれている可能性が高く、被害としては死亡もあり得るので注意が必要である。健康食品管理士の皆様におかれては、折に触れそのようなリスク情報を消費者に届けることをお願いしたい。海外の危害情報については独立行政法人国立健康・栄養研究所の「健康食品」の安全性・有効性情報とともに、食品安全情報も活用して頂きたい。

<参考資料>

1) 食品安全情報

<http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/foodinfonews/index.html>

2) 事務連絡 平成25年10月9日 健康食品（OxyElite Pro）に関する注意喚起について

<http://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-11134500-Shokuhinanzanbu-Shinkaiatsus-hokuhinhokentaisakushitsu/0000025766.pdf>

3) 事務連絡 平成25年12月25日 OxyElite Pro（米国製サプリメント）に関する注意喚起について（再周知）

<http://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-11134500-Shokuhinanzanbu-Shinkaiatsus-hokuhinhokentaisakushitsu/0000033562.pdf>

4) 医薬品成分を含有するいわゆる健康食品の発見について

http://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-11126000-Iyakushokuhinkyoku-Kanshishidoumayakutaisakuka/kawagoeshi_2.pdf

Performance Evaluation of an Improved GC-MS Method to Quantify Methylmercury in Fish

Takahiro WATANABE^{*1}, Hiroyuki KIKUCHI¹, Rieko MATSUDA¹,
Tomoko HAYASHI¹, Koichi AKAKI² and Reiko TESHIMA¹

¹ National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

² Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment:
2-1-34 Jigyohama, Chuo-ku, Fukuoka 810-0065, Japan;

^{*} Corresponding author

Here, we set out to improve our previously developed methylmercury analytical method, involving phenyl derivatization and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). In the improved method, phenylation of methylmercury with sodium tetraphenylborate was carried out in a toluene/water two-phase system, instead of in water alone. The modification enabled derivatization at optimum pH, and the formation of by-products was dramatically reduced. In addition, adsorption of methyl phenyl mercury in the GC system was suppressed by co-injection of PEG200, enabling continuous analysis without loss of sensitivity. The performance of the improved analytical method was independently evaluated by three analysts using certified reference materials and methylmercury-spiked fresh fish samples. The present analytical method was validated as suitable for determination of compliance with the provisional regulation value for methylmercury in fish, set in the Food Sanitation law.

(Received November 7, 2014)

Key words: methylmercury; phenyl derivatization; GC-MS; fresh fish

Introduction

Methylmercury, an organomercury compound, has adverse health effects, such as marked distal sensory disturbances, constriction of visual field, ataxia, dysarthria, auditory disturbances, and tremors, due to its action on the central nervous system^{1), 2)}. The central nervous system of the developing fetus, in which the blood-brain barrier function is not fully developed, is reported to be particularly vulnerable^{*1, *2}. Due to concerns over adverse health effects, international organizations and governments have issued warnings regarding the consumption of methylmercury-contaminated foods, particularly fish and shellfish. In March of 2004, the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) lowered the provisional tolerable weekly intake of methylmercury from 3.3 to 1.6 µg/kg body weight/week. Also in 2004, the U.S. Food and Drug Administration revised its advice and recommended that pregnant women limit their consumption of specific kinds of fish and

shellfish^{*3}. On June 3, 2003, the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (MHLW) issued its "Advice on Fish Consumption and Mercury". In 2005, MHLW also issued a modified proposal, "Advice for Pregnant Women on Fish Consumption and Mercury"^{*4}.

In 1973, MHLW set the provisional regulation value for mercury in fish and shellfish (excepting some fish species) at 0.4 ppm as total mercury and 0.3 ppm as methylmercury. In the appendix to the notification in which the regulation values were published, the analytical method for methylmercury (hereinafter referred to as the "official method") is presented^{*5}. In the official method, methylmercury is extracted with benzene under hydrochloric acid and then transferred to a cysteine-con-

* E-mail: tawata@nihs.go.jp

*1 "Food Safety Risk Assessment Related to Methylmercury in Seafood", Food Safety Commission of Japan, Tokyo. (2005). https://www.fsc.go.jp/english/topics/methylmercury_risk_assessment.pdf

*2 "Methylmercury; Environmental Health Criteria 101", WHO, Geneva (1990). <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc101.htm>

*3 "FDA and EPA Announce the Revised Consumer Advisory on Methylmercury in Fish", U.S. Food and Drug Administration and Environment Protection Agency (2004). <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2004/ucm108267.htm>

*4 "Advice for Pregnant Women on Fish Consumption and Mercury", Subcommittee on Animal Origin Foods, Food Sanitation Committee, Pharmaceutical Affairs and Food Sanitation Council, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, Tokyo (2005). <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/suigin/dl/051102-1en.pdf>

*5 "Provisional regulation value for mercury in fish and shellfish", The Ministry of Health and Welfare of Japan, Tokyo. Notification No. 99 (1973).

taining aqueous solution. The methylmercury is then once again transferred to benzene by acidifying the aqueous cysteine-containing layer, and is then measured using a GC-ECD equipped with a packed column. Because benzene (a carcinogenic solvent) is used for extraction and ECD (which requires special control for its β -ray source) is used for the measurement, the official method is not versatile. In addition, it has been reported that, depending upon the species examined, the recovery of methylmercury in analyses of fish samples using the official method may be low³⁾.

In order to overcome the above-mentioned drawbacks associated with the official method, method providing more efficient extraction of methylmercury was developed by employing alkaline degradation of proteins, hexane washing to remove fats, and dithizone as the complexing agent. This method was also adopted by the Japanese Ministry of the Environment⁶⁾. The method uses toluene instead of benzene; but, as in the official method, ECD is used for detection. Although a method employing inductively coupled plasma mass spectrometry for measurement of methylmercury has been reported⁴⁾, the detector is not sufficiently versatile for food analysis.

The authors previously developed a versatile analytical method involving phenyl derivatization of methylmercury and subsequent measurement by GC-MS, which is widely used in food analysis⁵⁾. In the present paper, this previously reported method (hereinafter referred to as the "original method") was improved to achieve the level of performance necessary for use in determining compliance with the provisional regulation value for methylmercury. The improved method was validated.

Materials and Methods

Samples

Certified reference materials (CRM) for validation (CRM 7402-a: cod fish powder; BCR-463: tuna fish powder; ERM-CE464: tuna fish powder; and CRM 7403-a: swordfish powder) were purchased from Seishin Trading Co., Ltd. Fresh fish samples (cod, tuna, mackerel, and bonito) were purchased at a supermarket in Tokyo.

Reagents

Methylmercury chloride was obtained from GL Sciences Inc. (Tokyo, Japan). Potassium bromide, anhydrous copper(II) sulfate, sulfuric acid, cysteine hydrochloride monohydrate, sodium acetate trihydrate, sodium dihydrogen phosphate dihydrate, disodium hydrogen phosphate dodecahydrate, sodium tetraphenylborate, and polyethylene glycol (PEG) 200 were obtained from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo, Japan). Other reagents were of pesticide residue analysis grade or special grade. Ultrapure water was produced using a Milli-Q purification system (Element 10) (Merck Millipore,

Billerica, MA, USA).

A methylmercury standard stock solution (1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was prepared by accurately weighing 58.2 mg of methylmercury chloride, dissolving it in toluene and adjusting the final volume to 50 mL with toluene. A methylmercury standard solution for spiking (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was prepared by accurately weighing 58.2 mg of methylmercury chloride, dissolving it in water and accurately adjusting the volume to 500 mL, and then diluting 3 mL of this solution to a final volume of 100 mL with water. A 1 mol/L potassium bromide solution was prepared by dissolving potassium bromide in water. Copper(II) sulfate-saturated 4 mol/L sulfuric acid was prepared by adding 200 mL of concentrated sulfuric acid to 600 mL of water, allowing it to cool, adjusting the volume to 900 mL with water, and dissolving anhydrous copper(II) sulfate until the solution was saturated. A 1% L-cysteine solution was prepared by dissolving 10.0 g of L-cysteine hydrochloride monohydrate, 8.0 g of sodium acetate trihydrate, and 125.0 g of anhydrous sodium sulfate in water and adjusting the final volume to 1 L. Sodium phosphate buffer (0.2 mol/L; pH 7.0) was prepared by mixing 0.2 mol/L sodium dihydrogen phosphate (acidic solution) and 0.2 mol/L disodium hydrogen phosphate (basic solution) to give pH 7.0.

A 1% sodium tetraphenylborate solution was prepared by dissolving 0.2 g of sodium tetraphenylborate in phosphate buffer (0.2 mol/L; pH 7.0). The 1% sodium tetraphenylborate solution was prepared immediately before use. A 1.5 mg/mL solution of PEG200 was prepared by dissolving PEG200 in toluene.

Equipment

The centrifuge used was a Model 6200 from Kubota Corporation (Tokyo, Japan). The homogenizer used was GM200 from Verder Scientific Co., Ltd. (Tokyo, Japan). The GC-MS used was a 6890N GC & 5975 MSD from Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA, USA).

The following conditions were used for GC-MS measurement: InertCap 5MS/NP (0.25 mm i.d. \times 30 m long, 0.25 μm film thickness) column (GL Sciences Inc.); oven temperature, 70°C(1 min) \rightarrow 20°C/min \rightarrow 280°C(5 min); injection port temperature, 250°C; transfer line temperature, 280°C; ion source temperature, 230°C; injection volume, 1 μL ; carrier gas flow rate, 1.0 mL/min (He); ionization method, EI; analysis mode, SIM; ions monitored, m/z 292 (quantitation ion), 294, and 277.

Analytical procedure

A sample of fresh fish was homogenized and 10.0 g of the homogenized sample was weighed and used for further analyses. A portion of CRM (1.0 g) was weighed and mixed with 9.0 g of water. Each sample was shaken with 100 mL acetone for 30 sec, and centrifuged. The supernatant was removed. 100 mL of toluene was added to the residue and the mixture was shaken for 30 sec, then centrifuged, and the supernatant was removed. The acetone- and toluene-washed residue was shaken with 40 mL of 1 mol/L potassium bromide solution, 40 mL of

⁶⁾ "Mercury Analysis Manual", 2004, Ministry of the Environment of Japan, Tokyo (2004). http://www.nimd.go.jp/kenkyu/docs/march_mercury_analysis_manual%28e%29.pdf

copper(II) sulfate-saturated 4 mol/L sulfuric acid, and 80 mL of toluene, and centrifuged. The toluene layer was collected. To the remaining water layer, 50 mL of toluene was added. The mixture was shaken for 10 min, and the toluene layer was collected after centrifugation and combined with the previous toluene layer. To the combined toluene layers, 50 mL of 1% L-cysteine solution was added and the mixture was shaken for 5 min. After being allowed to stand, the water layer was collected, and 30 mL of 6 mol/L hydrochloric acid and 30 mL of toluene were added. The sample was shaken for 5 min, and the toluene layer was collected. This procedure was repeated three times, and the volume of the combined toluene layers was adjusted to 100 mL with toluene. A 4-mL aliquot was removed from this solution, 5 mL of 0.2 mol/L phosphate buffer (pH 7.0) and 1 mL of 1% sodium tetraphenylborate solution were added to it, and phenyl derivatization was carried out by shaking for 10 min at room temperature. The reaction solution was centrifuged, the toluene layer was dehydrated with anhydrous sodium sulfate, 1 mL of the solution was accurately removed, and 0.5 mL of 1.5 mg/mL PEG200 was accurately added to obtain a GC-MS measurement solution.

Preparation of standard solutions for calibration curve

Aliquots of methylmercury standard stock solution were diluted with toluene to prepare standard solutions of 0, 5, 10, 25, 50, 75, and 100 ng/mL for use in constructing a calibration curve. The standard solutions were then subjected to phenyl derivatization and subsequent processing identical to that of analytical samples.

Preparation of blank and spiked samples

A blank sample was prepared by sufficiently homogenizing cod or tuna muscle that was confirmed beforehand to contain less than 0.15 mg/kg of methylmercury. A spiked sample was prepared by accurately adding 1 mL of a 3 µg/mL aqueous methylmercury solution to 10.0 g of the blank sample homogenate, mixing well, and allowing the sample to stand for 30 min prior to analysis.

Method validation

Four different CRMs and two different spiked samples were analyzed, and the trueness and precision (repeatability and intralaboratory reproducibility) were estimated. For the CRMs and spiked samples, two parallel analyses per day were carried out for 5 days. Simultaneously, two parallel analyses per day of the blank sample were carried out for 5 days. The analytical result for each spiked sample was obtained by subtracting the mean of the results obtained from analysis of the blank sample from the result for each individual spiked sample. One-way analysis of variance was performed for the 10 analytical results. The validation was independently carried out by three analysts (A, B, and C). Analysts A and B carried out the validation using CRMs and spiked samples in the same laboratory (laboratory I), whereas

analyst C carried out the validation using CRMs in a different laboratory (laboratory II). The validity of the analytical method was confirmed by comparing the estimates of trueness and precision with the performance criterion shown in Notification No. 0926001, "Guidelines for the validation of analytical methods for testing metals in food"^{*7}.

Results

Improvement of pretreatment and extraction procedure

In the original method, 1 mol/L potassium bromide solution and copper(II) sulfate-saturated 4 mol/L sulfuric acid were added to samples and methylmercury was extracted with toluene. Depending on the fish species analyzed, this sometimes resulted in substantial emulsion generation during extraction, greatly compromising the efficiency of the extraction procedure. Therefore, sample pretreatment using acetone and toluene, as employed in a collaborative study to validate a quantitative method for methylmercury⁽⁶⁾, was investigated for its potential to prevent emulsion generation. For pretreatment, 100 mL of acetone was added to a sample and then removed after shaking for 30 sec, followed by similar addition and removal of 100 mL of toluene. This resulted in a dramatic reduction in the frequency of emulsion generation in samples prepared from cod, tuna, mackerel, and bonito.

Optimization of phenyl derivatization conditions

In the original method, phenyl derivatization was carried out by transferring methylmercury to a 1% L-cysteine solution after toluene extraction, adding and mixing Walpole buffer (pH 1.0), adding *n*-heptane and 2% sodium tetraphenylborate solution, and then allowing the mixture to stand for 1 hr in a 30°C water bath with mixing every 10 min. However, repeated injection of measurement solutions prepared according to this procedure ultimately resulted in a significant reduction in GC-MS sensitivity, which was thought to be due to adsorption of various phenyl compounds generated by the decomposition of tetraphenylborate (*e.g.*, biphenyl) on parts of the instrument, such as liners. In order to avoid this decrease in sensitivity, reaction conditions that would reduce the amount of degradation products formed without impacting on the phenylation efficiency were investigated (sodium tetraphenylborate concentration, pH, reaction temperature, and reaction time). The generation of biphenyl, the degradation product formed in the highest amount, was used as an indicator to assess the effect of modifying the reaction conditions. We found that when the concentration of sodium tetraphenylborate was reduced from 2 to 1%, the efficiency of phenyl derivatization did not change. Therefore, the sodium tetraphenylborate concentration was set at 1% to decrease the amount of by-products formed.

The effect of pH on phenyl derivatization efficiency

^{*7} "Guidelines for the validation of analytical methods for testing metals in food", The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, Tokyo. Notification No. 0926001 (2012).

was next investigated in reactions carried out at 30°C by adding 5 mL of buffers of different pH, 1 mL of 1% sodium tetraphenylborate solution, and 2.5 mL of *n*-heptane to 1 mL of 100 ng/mL methylmercury solution. The following buffers were evaluated: 0.2 mol/L phosphate buffer at pH 2, 3, 4, 6, 7, 8, 11, and 12; 0.2 mol/L acetate buffer at pH 4, 5, and 6; and 0.2 mol/L Tris buffer at pH 7, 8, and 9. The effect of reaction time was investigated at reaction times of 0, 10, 20, and 30 min. For 0 time reaction, centrifugation was performed immediately after mixing of all solutions and solvent. Figure 1 shows the peak areas for methyl phenyl mercury and biphenyl generated by phenyl derivatization under various conditions. With increasing pH, the methyl phenyl mercury peak area decreased. However, the degree of the change was small, and the peak area for reaction at pH 7 was about 90% of that at pH 2. In contrast, the biphenyl peak area was greatest at pH 2, declined steeply up to pH 5, and was negligibly small at higher pHs. The methyl phenyl mercury peak area remained relatively constant regardless of the reaction time, and the reaction was considered to proceed quickly. In contrast, the bi-

phenyl peak area increased as the reaction time increased. No difference in the methyl phenyl mercury peak area was observed at reaction temperatures of 25, 30, and 40°C. Based on these results, phenyl derivatization reactions were carried out with 1% sodium tetraphenylborate solution in 0.2 mol/L phosphate buffer (pH 7.0) with shaking for 10 min at room temperature.

Subsequently, it was confirmed that under the above reaction conditions, methylmercury can be phenylated even in organic solvent, similarly to aqueous solutions. Toluene was selected as the organic solvent because it permits easy transfer of methylmercury. To 2.5 mL of a 40 ng/mL solution of methylmercury in toluene, 5 mL of 0.2 mol/L phosphate buffer (pH 7.0) and 1 mL of 1% sodium tetraphenylborate solution were added and reacted by shaking for 10 min, after which the toluene layer was collected (condition A). At the same time, to 2.5 mL of 40 ng/mL methylmercury in 0.2 mol/L phosphate buffer (pH 7.0), 2.5 mL of 0.2 mol/L phosphate buffer (pH 7.0), 1 mL of 1% sodium tetraphenylborate solution, and 2.5 mL of toluene were added and reacted by shaking for 10 min, after which the toluene layer was collected (con-

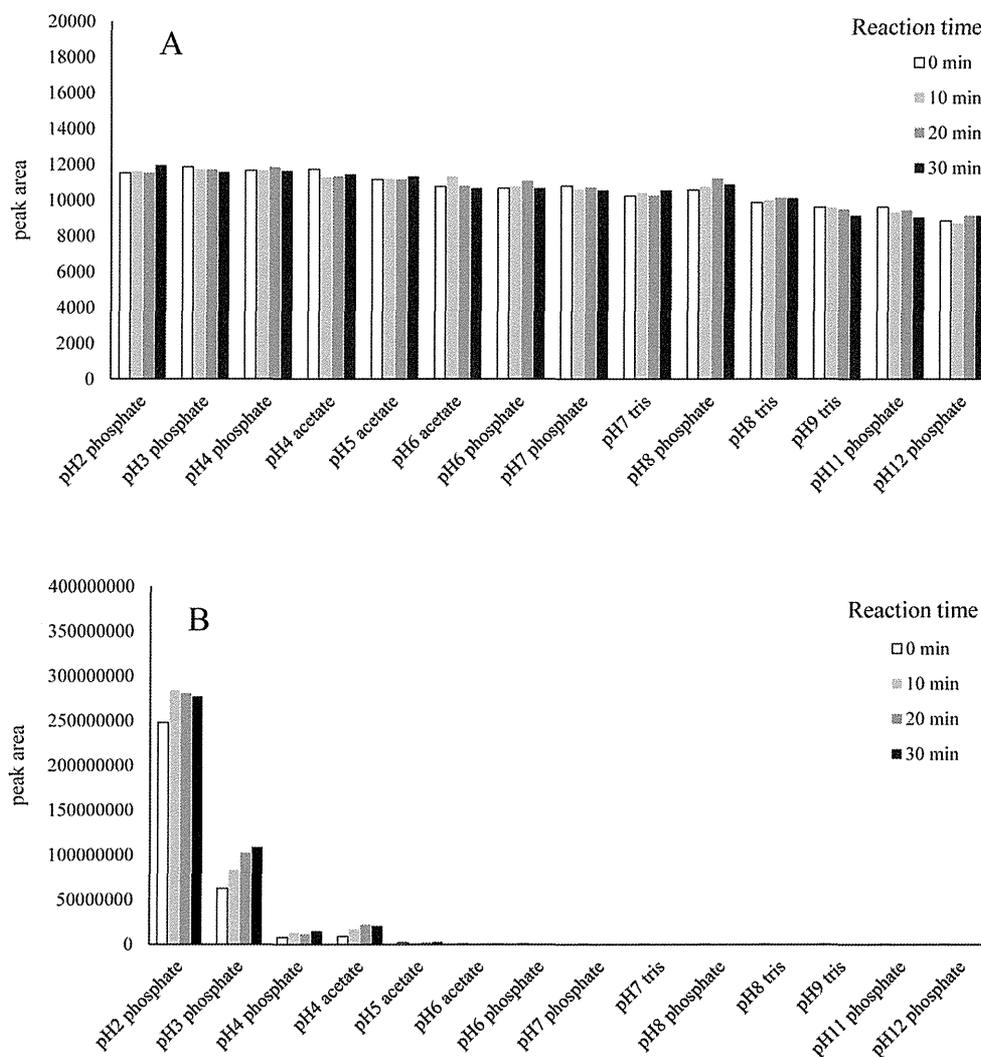


Fig. 1. Effects of pH and reaction time on (A) methyl phenyl mercury and (B) biphenyl GC-MS peak areas

dition B). The methyl phenyl mercury peak area obtained was $11,134 \pm 160$ under condition A and was $11,311 \pm 87$ under condition B ($n=3$).

The transfer conditions of methylmercury to toluene from acidified L-cysteine solution were also investigated. L-cysteine solution was acidified with 30 mL of 6 mol/L hydrochloric acid, and methylmercury was extracted with 30 mL of toluene three times. The transfer rate was evaluated based on the amount of methylmercury in toluene layers obtained in three steps. The transfer rate at the first procedure was 74.1%. At the second and third times, the rate was 19.0% and 5.1%, respectively. Thus, it was concluded that efficient derivatization can be achieved by using 1% sodium tetraphenylborate solution for the reaction after transfer of methylmercury in 1% L-cysteine solution to toluene by extraction three times.

Selection of PEG amount co-injected

In GC-MS calibration curves constructed from data obtained by direct injection of methyl phenyl mercury solutions prepared by the derivatization of methylmercury, the intercept was always negative. It was suspected that a portion of the injected methyl phenyl mercury was lost by adsorption in the GC-MS instrument. Therefore, the effect of co-injecting PEG to suppress adsorption of methyl phenyl mercury was investigated. As a preliminary experiment, 1 mL of measurement solution prepared from 20 ng/mL methyl mercury solution was mixed with 0.5 mL of 1.5 mg/mL PEG200 solution or 0.5 mL of toluene and both mixtures were injected into the GC-MS. The peak area of the solution containing PEG was 3884 ± 49 , while that of the solution not containing PEG was 2550 ± 190 ($n=3$). These results suggested that PEG worked as anticipated. Then, the conditions of PEG co-injection were optimized. Based on the molecular weight of methyl phenyl mercury, PEG200 and PEG300 were evaluated.

Measurement solutions containing 250, 500, or 750 ng of PEG200 or PEG300 and methyl phenyl mercury were prepared, and 1 μ L of each solution was injected into the GC-MS. Although, co-injection with PEG increased the peak area about 1.5 times as described above, increasing the amount of PEG injected from 250 to 750 ng produced only a slight increase in the methyl phenyl mercury peak area. In addition, no difference in peak area was observed between PEG200 and PEG300 (Table 1). Because the boiling point of PEG200 is lower than that of PEG300, so that the final GC column temperature can

be set lower, PEG200 was selected for co-injection. In order to minimize contamination of the GC-MS instrument, the minimum effective amount of PEG200 was co-injected, which was 500 ng. No extra peaks were found on the chromatogram of methyl phenyl mercury solution (100 ng/mL as methyl mercury) co-injected with 500 ng of PEG200 (Fig. 2)

Elimination of ethylenediamine-N-propyl silane column (PSA column) clean-up from the original method

In the original method, the orange pigment thought to be a reaction by-product of the phenyl derivatization of methylmercury was removed using a PSA column. In the present method, this pigment was not observed, presumably due to the improvements in the phenyl derivatization method. Therefore, we considered that removal of the PSA column purification step from the analytical procedure would be desirable from the viewpoint of labor reduction. However, it was unclear whether or not the matrix derived from the sample and any remaining derivatization reagent need to be removed. To address this issue, measurement solutions prepared using various fish samples (cod, tuna, mackerel, and bonito) were analyzed after purification using a PSA column and the results were compared with those of measurement solutions not subjected to PSA purification. A measurement solution prepared from methylmercury standard solution was similarly measured as a control. No difference was observed between the chromatograms of the methylmercury standard solution and those of the fish samples. The ratios of the methyl phenyl mercury peak areas for the measurement solutions prepared with and without PSA column purification from methylmercury standard, cod, tuna, mackerel, and bonito were in

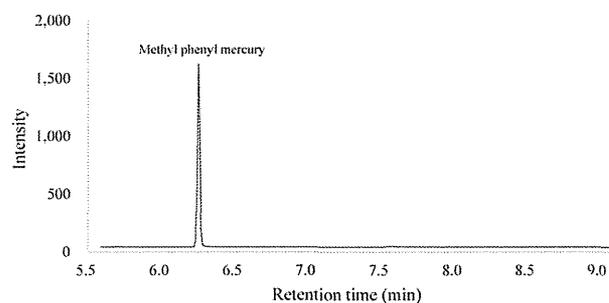


Fig. 2. GC chromatogram obtained from methyl phenyl mercury co-injected with 500 ng of PEG200

Table 1. Comparison of GC-MS peak areas for methyl phenyl mercury co-injected with different amounts of PEG200 or 300

Methyl mercury (ng/mL)	Peak area of methyl phenyl mercury					
	Amount of PEG200 co-injected (ng)			Amount of PEG300 co-injected (ng)		
	250	500	750	250	500	750
0	—	—	—	—	—	—
2.5	460	480	513	452	459	507
100	18,597	18,754	19,269	18,642	18,976	19,389

—: signal not detected

the range of 1.00–1.01 in all cases. Thus, the use of a PSA column to remove the pigment had only a minimal effect on both the chromatograms and the peak areas, and as the degree of purification afforded by the column was considered to be small, its use was omitted.

Validation of the analytical method

The trueness, repeatability, and intralaboratory reproducibility estimated based on the analytical results for four different CRMs are shown in Table 2. The same parameters estimated based on the analytical results for

two different spiked samples are shown in Table 3. Trueness is the closeness of agreement between the average of the analytical results and the reference quantity value (certified level for CRMs or the spiked level) in this study. Repeatability is estimated as the standard deviation of the analytical results obtained in repeated determinations. Intralaboratory reproducibility is one kind of estimate of intermediate precision, and is estimated as the standard deviation of the analytical results under intralaboratory condition in this study. The trueness estimated from analysis of the certified reference

Table 2. Trueness, repeatability and intralaboratory reproducibility estimated by analysis of certified reference materials

Sample	Certified level (mg/kg)	Analyst	Result (mg/kg)						Trueness (%)	Repeatability (RSD%)	Intralaboratory reproducibility (RSD%)	
			1st	2nd	3rd	4th	5th	average				
CRM 7402-a	0.58±0.02 (as Hg)	A	Portion 1	0.5261	0.4763	0.5013	0.5072	0.4982	0.504	87	0.8	3.9
			Portion 2	0.5347	0.4771	0.5036	0.5108	0.5074				
		B	Portion 1	0.5685	0.5397	0.5518	0.5102	0.5339	0.544	94	1.4	4.3
			Portion 2	0.5756	0.5595	0.5568	0.5165	0.5251				
		C	Portion 1	0.5200	0.4816	0.5201	0.4413	0.4420	0.493	85	5.5	7.3
			Portion 2	0.5017	0.5085	0.5374	0.4574	0.5184				
BCR-463	3.04±0.16 (as MeHg)	A	Portion 1	3.078	2.952	3.030	3.091	3.000	2.984	98	4.6	4.6
			Portion 2	3.056	3.137	2.904	2.910	2.677				
		B	Portion 1	2.997	2.896	2.841	2.924	2.865	2.944	97	3.0	3.0
			Portion 2	2.913	3.079	2.865	3.055	3.008				
		C	Portion 1	2.959	2.752	2.788	2.742	2.677	2.801	92	6.7	6.8
			Portion 2	2.700	2.664	2.857	3.263	2.607				
ERM-CE464	5.50±0.17 (as MeHg)	A	Portion 1	5.432	6.032	5.078	4.942	5.321	5.225	95	6.0	6.5
			Portion 2	5.316	5.086	4.866	4.976	5.205				
		B	Portion 1	5.332	5.287	4.830	5.150	5.367	5.245	95	2.6	3.8
			Portion 2	5.456	5.150	5.093	5.436	5.349				
		C	Portion 1	5.607	4.805	4.739	5.085	4.664	5.013	91	3.6	6.1
			Portion 2	5.341	4.854	5.180	4.986	4.872				
CRM 7403-a	5.00±0.22 (as Hg)	A	Portion 1	4.562	4.620	4.419	4.457	4.433	4.619	92	6.0	6.0
			Portion 2	5.297	4.497	4.853	4.478	4.575				
		B	Portion 1	4.752	4.724	4.701	4.776	4.839	4.750	95	0.9	1.6
			Portion 2	4.819	4.689	4.619	4.718	4.861				
		C	Portion 1	5.177	4.185	4.331	4.762	4.406	4.476	90	4.9	6.9
			Portion 2	4.600	4.225	4.285	4.370	4.416				

Table 3. Trueness, repeatability and intralaboratory reproducibility estimated by analysis of spiked samples

Sample	Spiked concentration (mg/kg)	Analyst	Result (mg/kg)						Trueness (%)	Repeatability (RSD%)	Intralaboratory reproducibility (RSD%)	
			1st	2nd	3rd	4th	5th	average				
Cod	0.3	A	Portion 1	0.2449	0.2616	0.2726	0.2766	0.2692	0.266	89	1.2	5.0
			Portion 2	0.2486	0.2590	0.2812	0.2791	0.2709				
		B	Portion 1	0.3012	0.2879	0.2750	0.2814	0.2868	0.285	95	4.4	4.4
			Portion 2	0.2781	0.2855	0.2710	0.3111	0.2739				
Tuna	0.3	A	Portion 1	0.2613	0.2569	0.2435	0.2352	0.2913	0.265	88	6.7	8.1
			Portion 2	0.2554	0.2819	0.2917	0.2481	0.2866				
		B	Portion 1	0.2672	0.3318	0.2663	0.3181	0.3058	0.294	98	6.3	7.6
			Portion 2	0.3004	0.2952	0.2694	0.2874	0.2991				

materials was 87–98% for analyst A, 94–97% for analyst B, and 85–92% for analyst C. The repeatability, expressed as RSD%, was 0.8–6.0% for analyst A, 0.9–3.0% for analyst B, and 3.6–6.7% for analyst C. The intralaboratory reproducibility was 3.9–6.5% for analyst A, 1.6–4.3% for analyst B, and 6.1–7.3% for analyst C. With respect to analyses of the spiked samples, the estimated trueness was 89 and 88% for analyst A and 95 and 98% for analyst B. The repeatability was 1.2 and 6.7% for analyst A and 4.4 and 6.3% for analyst B. The intralaboratory reproducibility was 5.0 and 8.1% for analyst A and 4.4 and 7.6% for analyst B.

Discussion

Phenyl derivatization of methylmercury

In the original method, the conditions for the reaction of tetraphenylborate and methylmercury were investigated in the presence of L-cysteine. When the pH exceeded 2, the amount of methyl phenyl mercury formed decreased. Therefore, the reaction was carried out at pH 0.5–1.5 at 30°C for 1 hr. In this study, the effect of omitting L-cysteine from the reaction conditions was investigated. In the absence of L-cysteine, no decrease in the amount of methyl phenyl mercury formed was observed in the range of pH 2–9. Accordingly, the reported decrease in the amount of methyl phenyl mercury formed at $\text{pH} \geq 2$ with the original method was considered to be due to the formation of a complex between methylmercury and L-cysteine, and the optimum pH of the derivatization reaction itself was considered to be in the above-mentioned range. When the derivatization reaction was carried out in the neutral pH range, the amount of phenyl compounds formed, including the sodium tetraphenylborate degradation product biphenyl, decreased, and unlike the case of the original method, no formation of orange pigment was observed. Therefore, performing the derivatization reaction in the neutral pH range reduces the amount of undesired by-products formed without decreasing the concentration of methyl phenyl mercury in the measurement solution, thus lessening the potential for contamination of the GC instrument.

When methylmercury was extracted from a sample into the toluene layer and then transferred into water, 1% L-cysteine solution was used to increase the percentage of transfer. Under neutral pH conditions, L-cysteine and methylmercury form a complex, and the methylmercury contained in this complex cannot be phenylated by sodium tetraphenylborate. Therefore, phenylation of methylmercury with sodium tetraphenylborate in toluene in the absence of aqueous L-cysteine was investigated. In this case, the amount of methyl phenyl mercury formed in toluene was the same as that formed when methylmercury was phenylated in aqueous solution. In addition, the reaction proceeded easily upon shaking for 10 min at room temperature. It is not known whether this phenyl derivatization reaction takes place in the water layer, in the toluene layer, or at the interface between these layers.

In order to phenylate methylmercury in toluene solution, a step was added to the analytical procedure, in which methylmercury is again transferred from the L-cysteine solution to toluene. By adding this step, the need to transfer methyl phenyl mercury from the reaction solution to *n*-heptane, as was required in the original method, was eliminated.

Method validation

The following fish-based reference materials containing certified levels of methylmercury were selected for method validation: CRM 7402-a (cod fish powder), BCR-463 (tuna fish powder), ERM-CE464 (tuna fish powder), and CRM 7403-a (swordfish powder). The certified levels of methylmercury in the dry state were 0.58–5.00 mg/kg, concentrations close to the provisional regulation value of 0.3 mg/kg (wet weight).

The trueness, repeatability and intralaboratory reproducibility estimated by using independent analytical results obtained by three analysts (analyst A, B, and C) under various conditions were in agreement with the target values shown in the validation guidelines for test methods for metals (*i.e.*, trueness, 80–110%; repeatability, <10% [RSD%]; and intralaboratory reproducibility, <15% [RSD%]). The trueness estimate for the lowest-concentration of CRM7402-a sample was slightly lower than that for the other CRMs for all three analysts; but no systematic difference was observed with respect to precision.

The number of available reference materials containing certified levels of methylmercury is limited. The concentration to be confirmed by the analytical method used for the determination of compliance with the provisional regulation value may not necessarily be in agreement with the certified value. In addition, CRMs are usually expensive; thus, they are not easy to procure. Furthermore, in order to ensure test reliability, the analytical method must be validated using actual samples (wet samples of targeted fish species) before it is used to determine regulatory compliance. Therefore, the performance of the improved method was also evaluated using spiked samples. Samples usable as blanks were selected by analyzing the methylmercury content of several species of fresh fish purchased at a market. Fish found to contain less than 0.15 mg/kg, which corresponds to one-half the provisional regulation concentration, were selected for use as blanks. In the general preparation of spiked samples, it is desirable to use a solvent that is miscible with the sample; thus, an aqueous solution of methylmercury was used for this purpose.

Because some methylmercury is contained in the blank sample, variations in the concentration of mercury in the blank sample and variations arising from analysis contribute to the variations in the measured concentration of methylmercury. In order to reduce the first variation as much as possible, the blank sample was mixed to be as homogeneous as possible. The SD for the results of 10 analyses of the methylmercury concentration in the cod blank sample was 0.0028–0.007 mg/kg. The SD for

the results of 10 analyses of the methylmercury concentration in the tuna blank sample was 0.0068–0.011 mg/kg, slightly larger than that of the cod blank sample. The SD for the analytical results of the spiked samples was ≥ 2 times the SD of the results for the blank samples. Thus, the contribution made by non-homogeneity of the blank sample to the precision estimates was not large.

The trueness, repeatability and intralaboratory reproducibility estimated based on the analytical results obtained by analysts A and B were similar to the values estimated from analyses of certified reference materials, in agreement with the target values specified in the guidelines. Thus, we concluded that validation of an analytical method is possible in circumstances where only samples containing the analyte are available.

Conclusion

In the present study, we improved the original method for the analysis of methylmercury in fish *via* phenyl derivatization and subsequent GC-MS measurement. By optimizing the phenyl derivatization reaction conditions, the formation of degradation products from the phenyl derivatization reagent could be successfully reduced. In addition, undesirable adsorption of methyl phenyl mercury within the GC-MS instrument was suppressed by the co-injection of PEG200.

The performance of the improved method was evaluated by three independent analysts using CRMs, and the practicability of validation using spiked samples was also demonstrated. The results of these analyses were in agreement with the target values specified in the guide-

lines for the validation of test methods for metals. Thus, the present improved analytical method is valid for determining compliance with the provisional regulation value for methylmercury in fish.

Acknowledgments

This study was supported by a Health and Labour Sciences Research Grant for "Research Concerning Evaluation of the Intake of Toxic Substances such as Dioxins through Food and Associated Method Development" from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan.

References

- 1) Harada, M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit. Rev. Toxicol.*, **25**, 1–24 (1995).
- 2) Clarkson, T. W., Magos, L., Myers, G. J. The toxicology of mercury—Current exposures and clinical manifestations. *N. Engl. J. Med.*, **349**, 1731–1737 (2003).
- 3) Itano, K. Mercury in seafood and assessment of risk. *Seikatsu Eisei (J. Urban Living & Health Assoc.)*, **51**, 57–65 (2007).
- 4) Rai, R., Maher, W., Kirkowa, F. Measurement of inorganic and methylmercury in fish tissues by enzymatic hydrolysis and HPLC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, **11**, 1560–1563 (2002).
- 5) Sakamoto, T., Akaki, K., Watanabe, T., Matsuda, R., Hiwaki, H. Development of the GC-MS method following phenylation to quantify methylmercury in foods. *Bunseki Kagaku*, **61**, 327–333 (2012).
- 6) Hight, S. C. Rapid determination of methyl mercury in fish and shellfish: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 667–672 (1987).

食品に含まれる有害物質

トランス脂肪酸と多環芳香族炭化水素類

渡邊敬浩 堤 智昭

わたなべ たかひろ 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 第三室長 連絡先：〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1
つづみ ともあき 同 第二室長

食品に本来含まれている化学物質が、加熱といった加工によって変化し有害物質となることが知られている。この事実は「焼き魚の焦げた部分は食べないように」といった食生活の知恵に古くから反映されてきている。現在では、食品に由来し加工を原因として生成する有害物質には複数が知られており、それらを総称して製造副生成物と呼んでいる。本稿では、複数が知られる製造副生成物中、トランス脂肪酸と多環芳香族炭化水素類について概説する。

トランス脂肪酸

情報伝達の不十分さもありトランス脂肪酸に対する一般の認識に混乱があると感じている。この混乱解消の一助となることを期待し、本稿では詳細を記載するのではなく俯瞰することで、トランス脂肪酸と今後どのようにつきあえばよいのかを考えてみたい。なお記述のもととした情報や知見の詳細は、食品安全委員会が2011年に取りまとめた評価書をもとに、適宜入手し確認していただければ幸いである。

1. トランス脂肪酸とは何か？

言うまでもなく、脂質はヒトのエネルギー源であり栄養として不可欠である。栄養学的に重要な脂質には、脂肪酸と中性脂肪が含まれる。

脂肪酸とは、炭化水素鎖の末端にカルボキシル基を有する総炭素数が4~36の分子である。また中性脂肪とは脂肪酸とグリセロールがエステル結合した化合物である。食品に主として含まれているのは、3分子の脂肪酸がグリセロールにエステル結合したトリアシルグリセロールであり、これを摂取し代謝することでヒトは活動に必要なエネルギーを抽出している。その名称の一部であることから分かりますとおり、トランス脂肪酸は脂肪酸の一種である。食品国際規格の策定等を主務とする国際政府間組織であるコーデックス(Codex)委員会では、トランス脂肪酸を「少なくとも1つ以上のメチレン基で隔てられたトランス型の非共役炭素一炭素二重結合を持つ一価不飽和脂肪酸及び多価不飽和脂肪酸のすべての幾何異性体」と定義している。総炭素数並びに分子内の二重結合の位置および数の違いに応じ、たくさんの種類の脂肪酸(脂肪酸分子種)が存在する。そのため、理論上はそれら脂肪酸分子種の数だけトランス脂肪酸分子種が存在すると言っても過言ではない。

トランス脂肪酸が話題に取り上げられる際、特定の1つの物質が想起されているように感じることが多いが、共通の特徴を有する多数の脂肪酸分子種が総じてトランス脂肪酸であることを明確に理解することが、トランス脂肪酸に関

連する諸問題を考えるための出発点になるだろう。食品には脂肪酸でなく脂肪が主として含まれることから、トランス脂肪酸ではなくトランス脂肪として扱われる場合もある。なお、現在 Codex 委員会によるトランス脂肪酸の定義は世界保健機関 (WHO) が設置する食事と健康に関する栄養ガイダンス専門家諮問グループ (NUGAG) において見直しが検討されている。

2. トランス脂肪酸分析の限界とそれに伴う科学的知見の制約

流通する個々の食品や1回の食事に含まれるトランス脂肪酸の量は、濃度実態の把握や健康リスク評価の基礎となる科学的知見である。濃度を知るために必要な分析の基本は、試料からの抽出(精製)、分離、検出(同定)、そして定量である。また分析するためには、はじめに分析対象を決めなければならない。ここでいう分析対象とは、特定のトランス脂肪酸分子種の1つ1つを指す。理論上存在し得るトランス脂肪酸分子種のうち、どの分子種が食品に含まれているかも十分に知られていない。科学的知見が不足する状況で、やみくもに不特定多数のトランス脂肪酸分子種を分析対象とすることは非効率的であり、分離の観点からは実現不可能である。さらに同定と定量には、試料と標準品との間での結果比較が不可欠である。そのため、標準品の存在しない分子種は分析対象になり得ない。しかし、トランス脂肪酸標準品の入手はごく一部の分子種に限られているのが現状である。分析対象の選択と標準品の制限の他、Codex 委員会分析・サンプリング法部会 (CCMAS) では、現在妥当性確認中の新規トランス脂肪酸分析法の審議に関連して、試料となる食品の種類に応じた抽出の問題点や、分析可能な濃度の下限に関する懸念が情報として共有されている。分析上の工夫はあり得るが、これがトランス脂肪酸分析の限界である。つまり、これまでに報告されているトランス脂肪酸の濃

度等は、分析可能な範囲で得られた制約のある知見であることに留意すべきである。ただし、同定されたトランス脂肪酸分子種の一定以上濃度の値は信頼できるといって良いだろう。分析の限界にも強く関係するが、トランス脂肪酸分子種別のリスク評価は十分でなく、総じてトランス脂肪酸としてのリスクが評価されている。

3. トランス脂肪酸を含む食品

トランス脂肪酸を含む代表的な食品には、硬化油と反芻動物(ヤギやヒツジ、ウシ)由来の畜肉および乳製品が挙げられる。ただし、硬化油と畜肉乳製品のそれぞれに主として含まれるトランス脂肪酸分子種は異なる。硬化油ではエライジン酸が主であり、畜肉乳製品ではバクセン酸が主である。硬化油は、部分水素添加の手法によりシス型不飽和脂肪酸を飽和脂肪酸に変化させることで製造された工業製品である。代表的な硬化油であるマーガリンやファットスプレッドを想起すると分かりやすい。硬化油を原料とするペストリー等の各種食品にも必然的にエライジン酸が含まれる。エライジン酸は、部分水素添加つまりは製造方法を原因として副次的に生成することが知られている。エライジン酸生成の原因が明らかになって以降、事業者らの取り組みにより製造方法は改善され、現在の硬化油のエライジン酸濃度は劇的に低下したといわれている。一方、反芻動物由来の畜肉乳製品に含まれるバクセン酸は、当該動物の胃に生息する微生物により天然に生成することが知られている。努力によって改善できる製造方法と違い、天然に存在する畜肉乳製品のバクセン酸濃度を低減させることは極めて困難である。

4. トランス脂肪酸によりもたらされる可能性のある健康危害とそのリスク

トランス脂肪酸の過剰摂取によりもたらされる可能性のある健康危害として冠動脈疾患が挙げられる。冠動脈疾患に関係する因子として他にも喫煙や高血圧、糖尿病、加齢が挙げられる

が、それら因子によるリスクに比べるとトランス脂肪酸のリスクは低い。またトランス脂肪酸を摂取後直ちに冠動脈疾患を患うことになるわけではない。継続的な摂取が問題になり得る。さらに、摂取量によってはもとより低いリスクがさらに低くなる。トランス脂肪酸のリスクを考える上で、WHOが示している「総エネルギー摂取量の1%未満」という値が摂取量の指標となる。集団の平均摂取量を見ると、欧米の一部の国の調査では1%を超えることが報告されている。一方、わが国で実施された調査では、平均摂取量として1%を超える報告はない。この違いは国レベルでの食習慣の違い(あるいは食文化の違い)によるものと推測される。なお、後述する行政施策や前述の硬化油製造方法の改善が効果を上げ、過去には高かった国の摂取量も近年では減少している。

5. トランス脂肪酸をめぐる各国の対応

トランス脂肪酸摂取量の低減を目的とし、これまでにも多くの国が、食品製造事業者また飲食事業者と協調して、食品に含まれるトランス脂肪酸量の低減や消費者への情報提供に取り組んでいる。わが国でも2011年に消費者庁が「トランス脂肪酸の情報開示に関する指針について」を公開し、食品製造事業者による自主的な表示を促している。最近では2015年6月に、トランス脂肪酸を含む硬化油の使用規制を米国食品医薬品局(FDA)が決定し、国内でも多数報道がされた。余談だが、これら報道の多くで「食品へのトランス脂肪酸の添加が禁止された」と説明されていた。この説明は明らかな間違いである。硬化油製造方法の改善について述べたが、人の活動の結果意図せず生成した物質は、その活動の見直しにより低減させるあるいは完全になくすことも可能であろう。また、人の活動が原因なのだから、人の努力によってなくそうと考えるのも自然かと思う。米国FDAは今回の発表を行う数年前から食品製造事業者に改

善策の実行可能性についてヒアリングを行った。その結果から実行可能と判断し、「トランス脂肪酸を含む硬化油を、その他の一般に安全と認識されている(GRAS; Generally Recognized As Safe)食品と同じように使用すること」を禁止した。全食品におけるトランス脂肪酸含有が禁止されたのでも、天然由来のトランス脂肪酸の含有が禁止されたのでも、ましてやトランス脂肪酸の添加が禁止されたのでもない(語弊のないよう補足しておく)と、トランス脂肪酸にはベネフィットが認められていないので、そもそも添加されない。規制対象となった硬化油であっても、使用の目的と量やリスクに関する科学的根拠を提出し当局により妥当と判断されれば、使用される可能性はある。なお、天然に存在する有害物質については、合理的に可能な限りの低減策を講じるのが国際的なリスク管理の基本ではある。しかし、天然由来のトランス脂肪酸の場合にはそのような低減策がないのが現実である。無くすことができない有害物質によるリスクもまた、無くしようがない。そのような有害物質とは、あえてリスクを高めないように、個々人が自分の食生活を律しながらつきあっていくことが必要になる。先人の知恵あるいは常識に学び、バランスの良い食生活を営み、時に望むままに食の楽しみを享受するぐらいが丁度良いのだろうと考える。

6. トランス脂肪酸に関するまとめ

本稿で概説したとおり、トランス脂肪酸を特定の健康危害をもたらす因子(ハザード)の一つであると考えerことは妥当であろう。ただし同じ健康危害をもたらす他のハザードに比べるとリスクは小さい。特に摂取量の少ない日本人にとってのリスクは、摂取量の多い諸外国の人々に比べると、さらに小さい。その背景には食習慣の違いがある。一般論として、限られた資源には優先順位をつけ、小さなリスクの回避よりは大きなリスクの回避あるいは、知られていな

いハザードの発見とリスク評価に費やすことで、トータルとして健康の維持・向上への効果は大きくなる。「リスク」という言葉を「やばい」という言葉に換えて考えると理解しやすいかもしれない。トランス脂肪酸によるリスクは、「やばさがないとは言い切れない」といった程度かと思う。例えば、コメを主食とする日本人にとっては、コメに含まれる無機ヒ素のほうがトランス脂肪酸に比べてよほどやばい。ただし、やばいといってむやみに恐れるのではなく、どのくらいやばいのかの程度を落ち着いて考え、「偏食や過食をしなければ特に問題なし」といった程度のやばさだと個人が納得できることが大事になるだろう。そのためには、難しいと敬遠されがちな科学的根拠に基づく説明を、聞く側の立場に立って正しく理解してもらえるようにする、そのためのコミュニケーションのあり方がますます重要になるのかもしれない。

多環芳香族炭化水素類

多環芳香族炭化水素類(PAHs)については古くから食品中に含まれることが知られている。最近では2012年に韓国において、韓国内の基準値を超えるBenzo[a]pyrene(BaP)が検出された鯉節をスープに使用したとして、日本でも該当製品の回収が行われたことは記憶に新しい。ここでは、食品に含まれるPAHsに関して最近の情報も含めて述べる。

1. PAHsとは

PAHsとはベンゼン環を2つ以上持つ炭化水素化合物の総称であり、ベンゼン環の数や位置により多くのPAHsが存在する。PAHsは化学的安定性が比較的高く、脂溶性が高い性質を有する。PAHsは食品の燻製や乾燥、加熱(直火調理)などの過程で生成されることが知られており、これらの加工処理をした食品ではPAHsの含有が懸念されている。この他、

PAHsは化石燃料である石炭や石油の燃焼に伴っても生成するため環境中に広く存在している。一般的には食品がPAHsの主要な摂取源であると考えられており、最も代表的なPAHsとしてBaPが知られている。

2. PAHsの毒性とリスク評価方法

PAHsの急性毒性はそれほど強くなく、もっぱら発がん性が問題になる。EUの食品科学委員会(SCF)やFAO/WHO合同食品添加物専門家会議(JECFA)により、遺伝毒性や発がん性があると評価されたPAHs16種を表1に示した。なお、Benzo[c]fluoreneについては、JECFAの評価で発がんに関与している可能性が示唆されていることから表1に含めている。このような背景から、食品中のPAHs分析ではPAHs16種を分析対象とすることが多くなっている。

また、表1には国際がん研究機関(IARC)による各PAHsの発がん性評価についても示した。BaPはグループ1(ヒトに対して発がん性がある)に分類されており、他にも3種のPAHsがグループ2A(ヒトに対しておそらく発がん性がある)、9種のPAHsがグループ2B(ヒトに対して発がん性がある可能性がある)に分類されている。PAHsは遺伝毒性発がん物質であることから、ゼロでなければリスクはゼロではないとみなしてALARA(合理的に達成可能な限り低く抑える)の原則が適用されてきた。しかし、近年になり遺伝子発がん物質の定量的なリスク評価の手法の一つとして、曝露マージン(MOE)による評価が利用されるようになってきた。MOEは動物試験で得られたベンチマーク用量信頼下限値(BMDL)などの毒性影響に関する指標値をヒトの推定摂取量で割った値である。この値が10,000以上であれば健康への懸念が低くリスク管理の優先度が低いと判断される。代表的なPAHsであるBaPについてリスク評価されることが多いが、食品中の

表1 EUでモニタリングが推奨されている PAHs 16種

化合物名		PAHs 4種	PAHs 8種	分子式	分子量	IARCの分類
Benzo[c]fluorene	ベンゾ[c]フルオレン			C ₁₇ H ₁₂	216	Group 3
Benzo[a]anthracene	ベンゾ[a]アントラセン	✓	✓	C ₁₈ H ₁₂	228	Group 2B
Cyclopenta[c, d]pyrene	シクロペンタ[c, d]ピレン			C ₁₈ H ₁₀	226	Group 2A
Chrysene	クリセン	✓	✓	C ₁₈ H ₁₂	228	Group 2B
5-methylchrysene	5メチルクリセン			C ₁₉ H ₁₄	242	Group 2B
Benzo[b]fluoranthene	ベンゾ[b]フルオランテン	✓	✓	C ₂₀ H ₁₂	252	Group 2B
Benzo[k]fluoranthene	ベンゾ[k]フルオランテン		✓	C ₂₀ H ₁₂	252	Group 2B
Benzo[j]fluoranthene	ベンゾ[j]フルオランテン			C ₂₀ H ₁₂	252	Group 2B
Benzo[a]pyrene	ベンゾ[a]ピレン	✓	✓	C ₂₀ H ₁₂	252	Group 1
Indeno[1, 2, 3-c, d]pyrene	インデノ[1, 2, 3-c, d]ピレン		✓	C ₂₂ H ₁₂	276	Group 2B
Dibenzo[a, h]anthracene	ジベンゾ[a, h]アントラセン		✓	C ₂₂ H ₁₄	278	Group 2A
Benzo[g, h, i]perylene	ベンゾ[g, h, i]ペリレン		✓	C ₂₂ H ₁₂	276	Group 3
Dibenzo[a, i]pyrene	ジベンゾ[a, i]ピレン			C ₂₄ H ₁₄	302	Group 2A
Dibenzo[a, e]pyrene	ジベンゾ[a, e]ピレン			C ₂₄ H ₁₄	302	Group 3
Dibenzo[a, j]pyrene	ジベンゾ[a, j]ピレン			C ₂₄ H ₁₄	302	Group 2B
Dibenzo[a, h]pyrene	ジベンゾ[a, h]ピレン			C ₂₄ H ₁₄	302	Group 2B

PAHsの指標としてはPAHs4種やPAHs8種が適当であるとされている。

3. 食品中のPAHsとリスク評価

PAHsを含有する可能性が高いと考えられる燻製や乾燥・加熱などの加工処理をした食品を中心にPAHs含有量の調査が実施されている。例えば、よく焼いたり、バーベキューされた肉類ではBaP濃度が高くなり、最大5μg/kg程度になることが報告されている¹⁾。また、欧州食品安全機関(EFSA)ではEU内の約1万検体の種々の食品のPAHs濃度データを収集し、PAHs濃度が比較的高かった食品は燻製魚やココアバターおよび栄養補助食品等であり、全体の2.3%にあたる検体のBaP濃度が10μg/kgを超えたことを報告している²⁾。さらに、EFSAでは食品からのPAHs摂取量を推定しMOEによるリスク評価を行っている。平均的摂取者のMOEは、BaPで17,900、PAHs4種で17,500、PAHs8種で17,000、高摂取者のMOEは同じ順で、それぞれ10,800、9,900、9,600と試算された。平均的摂取者においては、MOEは10,000を大きく上回ることから、健康

リスクへの懸念は小さいとされている。一方で、高摂取者では10,000をわずかではあるが下回る場合もあることから、リスク管理措置が必要になる可能性が示されている。その他、JECFAにおいても食品からのBaP摂取量を推定しMOEによるリスク評価を行っており、平均的摂取者のMOEが25,000、高摂取者のMOEが10,000と試算されたことから、健康リスクへの懸念は小さいと結論している³⁾。

日本国内でも食品中のPAHs含有量が調査されており、特に鰹節および鰹節加工品が比較的高いPAHsを含有することが報告されている^{4,5)}。鰹節は製造時に焙乾工程において繰り返し燻されるため、PAHsが比較的高い濃度で含まれてくる。また、鰹節は主にダシに使用されるため、水でダシを取った際の鰹節からダシへのPAHsの移行率についても調査されている。PAHsの移行率は5%以下であり、PAHsは脂溶性が高い性質を有することから、水でダシを取る際にはダシに移行しにくいと考えられる^{5,6)}。その他、国内では、マーケットバスケット方式や陰膳方式によるトータルダイエツト