

25. 固相抽出カラムを用いた簡便・迅速な魚介類中のメチル水銀分析法の開発

○柿本 幸子 (地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所)

【研究目的】

越境汚染により日本近海のメチル水銀の汚染は拡大傾向にある。メチル水銀は人体に悪影響を及ぼすことから、主な摂取源である魚介類に含まれるメチル水銀の実態調査を継続して実施し、その濃度を監視していく必要がある。しかし、既存法は、人体に有害な試薬や管理が特殊な装置を必要とし、分析操作が煩雑で、前処理に長時間を要する。そこで、簡便・迅速な分析法を開発し、効率的なメチル水銀濃度の監視体制を確立することを考えた。

【研究の必要性】

海洋表層 100m の水銀量はこの 100 年間で 2 倍になり、現在も増加し続けている¹⁾。大気中の水銀は主にアジアから排出され、世界の排出量の約 50% を占めている¹⁾。大気中に排出された水銀は、大気や海流によって世界を巡り、環境に拡散する。水銀は、海洋中でメチル水銀となり、食物連鎖により魚介類に蓄積され、それらを摂取したヒトに影響を与える。排出機構が未熟な胎児では、母体が摂取した食品由来のメチル水銀による発育影響が懸念されている。よって、広範囲に魚介類中のメチル水銀の実態調査を実施し、メチル水銀濃度を監視していく必要がある。従来、メチル水銀の分析には、ECD/GC (電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフィー)²⁾ など、使用が制限される装置が必要であった。近年開発された GC/MS による分析法³⁾ においても、前処理に人体への影響が懸念されるトルエンを使用し、操作手順が多く煩雑である。そこで、特殊な装置を必要とせず、簡便で人体への影響が少ない方法を開発することが必要であると考えた。本研究では、食品分析で実績のある固相抽出カラムを利用し、汎用性の高い GC/MS を用いた簡便・迅速な分析法を開発する。

【研究計画】

1. 概要

前処理法に残留農薬分析の一つである QuEChERS 法⁴⁾ の手順を導入する。試料に硫酸、臭化カリウム溶液およびアセトニトリルを加え、メチル水銀を振とう抽出する。塩析後に遠心し、アセトニトリル層を分取する。その後、固相抽出カラムである HLB⁵⁾ を用いてアセトニトリル層に含まれる魚介類由来の脂質などの夾雑物質を除去する。誘導体化および GC/MS 条件は既報³⁾ に従う。試料は、当所に行政検査として一定の検体数が見込まれ、メチル水銀の暫定的規制値を超える可能性の高い魚種であるブリ、タイおよび脂質含有量が少ないエビ、カニなどを検討する。また、魚介類の認証標準物質を用いた検討も併せて実

施する。

2. 計画策定の経緯

土壌試料において塩酸溶液でメチル水銀が抽出されたことから⁵⁾、魚介類においても水系溶媒で抽出することを計画する。既知濃度の総水銀が含有されるブリを試料として使用し、事前検討を実施した。硫酸銅・硫酸溶液/臭化カリウム水溶液を加え抽出したのち、抽出液にトルエンを加え、液一液抽出した。魚介類では、総水銀のほとんどがメチル水銀として存在するといわれていることから、全てがメチル水銀であると仮定して回収率を計算した。その結果、試料中の約8割のメチル水銀が回収された。そこで、回収率の向上、および脂質除去を目的とし、QuEChERS法の手順の導入と、アセトニトリル抽出を計画した。アセトニトリルは、トルエンと比較して脂質溶解性が低く、また塩の添加により容易に水層と分離し、回収可能なことから、分析法への採用を考えた。

方法

1. 試料

大阪府内の小売店で購入したタイ、ブリ、サーモン、イワシ、エビ、カニ、貝柱を試料として選択した。試料は、フードプロセッサーで均質化した試料を冷凍保存し、分析前に解凍して使用した。認証標準物質 NMIJ CRM7402-a、NMIJ CRM7403-a、IAEA-436A は西進商事より購入した。

2. 分析装置と分析条件

分析装置：Agilent 社製 5973inert GC/MS

分析条件：オープン温度：70° C(1 min)→20° C /min→280° C (5 min) 注入口温度：250° C、トランスファーライン温度：280° C、キャリアーガス流量：1.0 mL/min (He) 分析モード：SIM、注入量：1 μL、モニターイオン：m/z 277、292、294*(*定量イオン)、イオン源温度：230° C、イオン化法：EI、試料注入法：スプリットレス

3. 試験溶液の調製

試料を均一に粉碎後、50 mL ポリプロピレン製遠沈管（以下50mL遠沈管と略す）に試料を秤量した。臭化カリウム溶液、硫酸溶液、アセトニトリル、セラミックホモジナイザーを加えて振とう後、遠心し、上清を回収した。再度アセトニトリルを加えて振とうし、遠心した。上清のアセトニトリル層を回収し、塩を加えて振とうし、遠心した。上清のアセトニトリル層を回収後、アセトニトリル溶液に加水し、HLB カラムで精製した。精製液にリン酸緩衝液、誘導體化試薬、ヘキサンを加え、振とう後、遠心した。ヘキサン層をガラス製試験管に採取し、無水硫酸ナトリウムを加え、脱水した。ヘキサン層をバイアルに採取し、PEG 溶液を加えて混合したものを測定溶液とした。

4. 分析法の性能評価

タイ、ブリ、サーモン、イワシ、エビ、カニ、貝柱、NMIJ CRM7403-a を基材とし、メチル水銀の暫定的規制値である 0.3 mg/kg に相当する濃度の添加試料を調製し分析した。妥当性確認は、分析者2名が3日行う実験計画を採用した。それぞれの分析値をもとに一元配置分散分析を実施した。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^{6,7)}を参考に目標値を満たすことを確認した。

【実施内容・結果】

1. 抽出条件

従来法では、試料 10 g に対して臭化カリウム溶液 40 mL、硫酸銅飽和硫酸溶液 40 mL、トルエン 80 mL を 250 mL 遠心管に加え 2 回抽出する。本法では、省スケール・簡便化を目的とし、50 mL 遠沈管で操作可能な試料量、試薬量を採用した。アセトニトリルを採用したことで、脂肪酸等の疎水性物質が抽出されにくくなり、分析の障害となるエマルジョンの形成を抑止できた。また、銅による機器への悪影響を回避する目的で、銅を除いた硫酸溶液のみを加えることとした。

2. 脂肪酸除去の検討

魚介類由来の脂肪酸を除去するため、固相抽出カラムの精製条件を検討した。抽出操作で得られたアセトニトリル溶液を GC/MS で分析したところ、脂肪酸由来のピークが多数検出された。そこでまず、HLB、PSA、NH₂、GCB の 4 種類のカラムを検討したが、これらカラムでは、脂肪酸除去効果が確認されなかった。次に、含まれる脂肪酸が HLB カラムで除去されやすくなるように、アセトニトリル溶液に加水後、HLB で精製した。その結果、トータルイオンクロマトグラムにおいて、9.6 分以降のイオン量が 1/2 以下になり、明確に脂肪酸由来のピークが減少することが確認された。アセトニトリル溶液に加水することにより、含まれる魚介類由来の脂肪酸の溶解度が減少し、HLB に保持されたと考えられた。図 1 に、NMIJ CRM7402-a タラ、IAEA-436A ツナについて HLB 未精製の溶液および加水後 HLB 精製した溶液のトータルイオンクロマトグラムを示した。加水後に HLB 精製を実施することでクロマトグラム全体のイオン量が減少し、HLB の精製効果が向上したことが示された。

3. 検量線と定量下限

検量線は、1~50 ng/mL の範囲で相関係数 0.999 以上であり、直線性は良好な値であった。検量線の下限である 1 ng/mL (試料中の濃度として 0.02 mg/kg 相当) の濃度において、そのクロマトグラムの S/N (シグナル/ノイズ) 比は 10 以上であった。

4. 性能評価

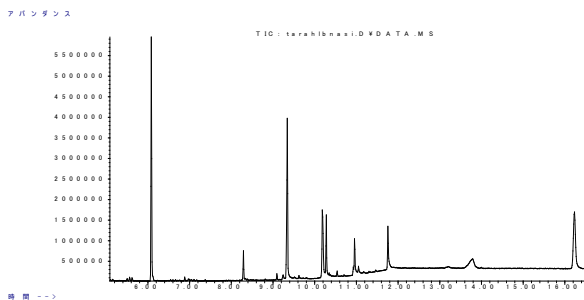
総水銀の値が 0.15 mg/kg 以下と確認された試料をブランク試料として使用した。基準値が設定されている物質では、基準値に相当する濃度の試料を枝分かれ実験計画に従い分析する。その後、得られた分析結果について解析し、目標値と比較することにより、分析法の妥当性を確認することが求められている。そこで、添加濃度は暫定的規制値 0.3 mg/kg とした。本法の性能評価試験を実施したところ、全ての試料において、真度は 86.1~98.3%、併行精度は 1.1~3.2%、室内精度は 2.1~8.2% (表 1) となり、目標値を満たした。

【考察と今後の課題】

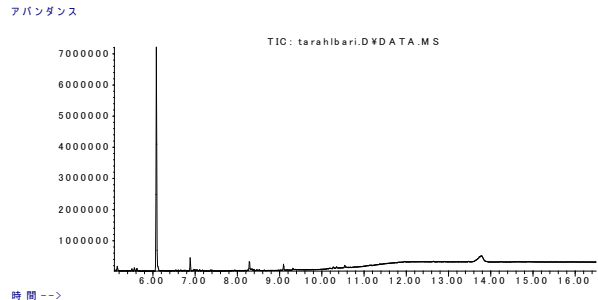
抽出手順に QuEChERS 法、精製手順に HLB を用いた固相抽出カラム精製、分析に汎用な GC/MS を用いた、簡便で迅速なメチル水銀分析法を確立することができた。本法は、人体や環境への負荷が懸念されるベンゼンやトルエンを使用しない安全な分析法である。一方で、現時点での本法の性能では、定量下限が試料中で 0.02 mg/kg であり、メチル水銀分析法として広く実態調査に使用されるためには、感度が若干、不足していると考えられる。今後、分析手順の最適化、分析装置の高感度化により、本法の感度の向上を検討する予定である。

【参考文献】

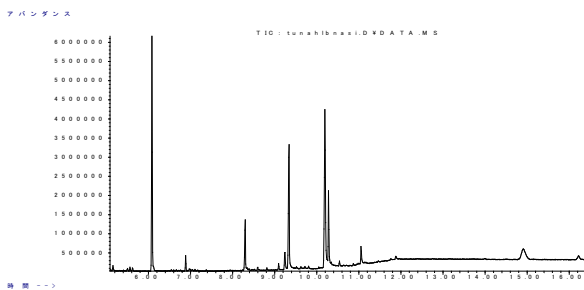
- 1) United Nations Environment Programme, UNEP (2013) Global mercury assessment 2013 sources, emissions, releases and environmental transport.
- 2) 魚介類の水銀の暫定的規制値について(昭和 48 年 7 月 23 日)、環乳第 99 号
- 3) Watanabe et al., Performance Evaluation of an Improved GC-MS Method to Quantify Methylmercury in Fish, Food Hygiene and Safety Science, 56(3), 69-76(2015)
- 4) Anastassiades et al. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce, JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL, 86(2), 412-431(2003)
- 5) Kakimoto et al., Development of a Solid Phase Extraction-Based Method for the Quantitative Analysis of Methylmercury in Soil and Sediment, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **109**, 332–337 (2022)
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知、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ついて、平成 20 年 9 月 26 日 付食安発第 0926003 号
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知、食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について、平成 22 年 12 月 24 日付食安発 1224 第 1 号



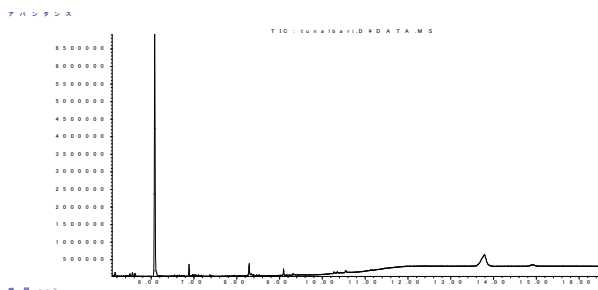
NMIJ CRM7402-a タラ (HLB 精製なし)



NMIJ CRM7402-a タラ (HLB 精製あり)



IAEA-436A ツナ (HLB 精製なし)



IAEA-436A ツナ (HLB 精製あり)

図 1. HLB 精製効果

表1. 妥当性評価結果

魚種	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
タイ	92.6	3.2	5.9
ブリ	92.6	1.2	2.1
サーモン	96.1	2.4	2.8
イワシ	94.2	2.2	3.8
エビ	90.8	2.6	4.1
カニ	98.3	2.3	3.1
貝柱	90.8	1.1	8.2
NMIJ CRM7403-a	86.1	3.0	4.4

【添加試料】 n=12

【ブランク試料】 n=6

添加濃度 : 0.3 mg/kg

【経費使途明細】

使 途	金 額
認証標準物質 IAEA-436A マグロ	49,500 円
産業技術総合研究所 認証標準物質 NMIJ CRM 7402-a	24,530 円
認証標準物質 SRM2974a イガイ	132,000 円
HLB	187,280 円
振込手数料	330 円
合 計	393,640 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円