

# 分析研究班



[ 1 ]分析研究班全体研究報告

【分析研究班班員】

	氏名	所属	役職名	研究テーマ
班長	柴田 康行	国立環境研究所化学環境研究領域	領域長	米中DPAA及び 関連化合物の分 析法の向上に関 する研究
班員	上野 清一	茨城県衛生研究所遺伝子科学部	部長	DPAA分析手法 の精度の向上に 関する研究
	貝瀬 利一	東京薬科大学生命科学部 環境動態化学研究室	教授	環境試料並びに 生体試料中の ジフェニルアル シン酸の測定法 の確立に関する 研究
	吉永 淳	東京大学新領域創成科学研究科	助教授	環境試料中DPA A及び関連有機 ヒ素化合物分析 の精度管理用 均一試料の作成

【分析研究班研究概要】

茨城県神栖市(旧神栖町)でおきた井戸水汚染事例は、有機ヒ素化合物であるジフェニルアルシン酸(DPAA)による環境汚染という特徴をもっている。DPAAは当初市販の試薬も存在しておらず、毒性に関する情報も限られている。

急性毒性以外、DPAAの環境動態や吸収、代謝、排泄、生体影響についてはほとんど情報がなく、汚染実態の解明やばく露による健康影響の調査を進め適切な対策を迅速にとっていくために、特に高感度な分析手法の確立が急務となっている。日本人は海の魚介類、海藻などに含まれる自然由来の各種ヒ素化合物を多く摂取するため、もともと生体成分中にさまざまな化学形態のヒ素を多く含んでおり<sup>1)</sup>、DPAAへのばく露の有無やその量を判断するには生体成分中のさまざ

まなヒ素化合物から DPAA を明確に区別して検出、定量しなければならない。

DPAA はこれまでほとんど分析対象となることがなく、本研究班ではそのための分析方法の開発、確立が急務となっている。上記のようにさまざまな無機、有機ヒ素化合物の中で DPAA 及び関連化合物を正確に精度良く測定するためには、個々のヒ素化合物を相互に分離し、定量できるための高度な分析手法の確立が必要であり、そのために HPLC/ICP-MS や LC/MS、LC/MS/MS 等の最先端の高度分析機器の応用が必要となる。一方、これらの高度な分析機器を持たない地方の研究機関でも対応できるように、一般的な原子吸光法等の機器を用いて DPAA の存在の有無をスクリーニング可能な前処理方法、簡易分析方法の開発、確立も急務となっている。さらにこうした研究を推進する上で、開発途中の各種 DPAA 分析法について随時相互比較を進め、その有効性と値の正しさを確認するとともに、問題点の有無を抽出できる精度管理手法の開発も急務となっている。複数の機関における異なった分析手法の相互比較には、実際の環境試料、生体試料と同じ材質で構成され DPAA を含むような精度管理用の共通均質化試料の利用がもっとも適当であり、そのための DPAA 含有共通均質試料の作成が強く求められている。

こうした背景のもと、本研究班は、迅速、高感度かつ信頼性の高い DPAA 並びに関連化合物の分析法の開発並びに各分野への応用を主たる目的として発足した。これまでに、異なる原理に基づく DPAA の迅速高感度分析法を作成し、水、底質、生体試料など各種環境試料への適用を通じて手法の信頼性、適用性に関する検討、評価を行った。また、さまざまな研究機関が緊急にスクリーニングに使えるように、原子吸光法をベースとした簡易分析方法の確立を目指し、固相抽出法や水素化物発生法と組み合わせた手法の基礎的な検討並びに実試料への適用性評価を行った。さらに、分析精度管理のための均質化試料の作成として、初年度は毛髪粉末試料への DPAA 添加試料の作成、二年目は DPAA 投与ラットの毛を使った均質化試料の作成を行い、それぞれ班員並びに外部の研究者の協力を得て分析の実施、相互比較を行った。一方、神栖においては当初の井戸水経由の直接ばく露に加えて、農業用水中に含まれたヒ素化合物が農作物中に主としてフェニルメチルアルシン酸(PMAA)という新しい化学形態で蓄積されることが明らかとなり、DPAA 以外の関連有機ヒ素化合物についても分析法を整備して環境中、生体中の存在実態を明らかにする必要性が生じている。こうしたこれまでの結果を受けてさらに研究を進めることを目的として、本年度は農作物中の DPAA 及び PMAA 等関連ヒ素化合物の分析法確立を目的として、分析法の開発、評価を継続するとともに、手法比較と評価のための汚染米均質化試料の作成、予備分析作業を行った。以下、各班員の活動報告をまとめる。

## 参 考 文 献

- 1) 柴田康行、森田昌敏：環境中ヒ素の化学形態 - 海洋環境を中心に - 、Biomed. Res. Trace Elem.,11, 1-24, 2000.

## [ 2 ] テーマ別研究報告

### [ 2.1 ] 米中 DPAA 及び関連化合物の分析法の向上に関する研究

主任研究者：柴田 康行 ( 国立環境研究所化学環境研究領域 領域長 )  
研究協力者：John S. Edmonds ( 国立環境研究所 主任研究員 )  
：伊藤 安紀 ( 株式会社国土環境 )  
：石井 一弘 ( 筑波大学大学院人間総合科学研究科 講師 )  
：神 和夫 ( 北海道立衛生研究所 企画室長 )  
：千葉 真弘 ( 北海道立衛生研究所 研究員 )

#### 1 概要

平成 15 年 3 月に見つかった茨城県神栖市 ( 旧神栖町 ) における有機ヒ素化合物汚染原因物質の環境中、生体中での動態、変化についてはまだ不明の点も多い。昨年度には新たにその類縁化合物フェニルメチルアルシン酸 ( PMAA ) が同定され、環境中での変化とその生物への蓄積、さらには毒性情報の取得が新たな研究課題として浮かび上がってきている状況である。

こうした状態を背景として、昨年度はジフェニルアルシン酸 ( DPAA )、フェニルアルソン酸 ( PAA ) に加えて PMAA の分析も同時に可能な新しい分離、検出条件の検討を行った。特に、ヒ素化合物の検出が確実にできる HPLC-ICPMS と、検出化合物の質量数やフラグメントパターンから構造に関連する情報を得ることのできる LC/MS、LC/MS/MS の両手法に同時に適用可能な HPLC 分離条件を確立できたことで、HPLC-ICPMS で手元の標準物質と異なる新しいヒ素化合物が検出できると LC/MS/MS でその構造に関連した情報を得てその新規物質の化学構造を推定することのできる研究推進体制を確立することができた。

この新たに確立した HPLC 条件はイオンクロマトグラフィーを基礎とするもので、各ヒ素化合物のイオニックな性質をもとに分離を行っている。自然起源のヒ素化合物を含め、一般の日本人の生体試料中にこれまで報告のある主要ヒ素化合物と、ジフェニルアルシン酸並びに関連化合物との分離ができ、各ヒ素化合物の定量を行うことのできる手法であるが、イオンクロマトグラフィーを基礎とする関係でイオン交換容量が小さく、生体成分のようなさまざまな夾雑物が存在する試料では、マトリックスの影響を受けやすいという欠点を有している。この問題をクリアして、特に生体試料にも適用可能な手法を確立するために、今年度は生体試料の前処理法の検討、確立を目的として研究を推進した。また、その他の生物試料として、分析精度管理のための共通均質化試料作製手法の確立にも貢献できるよう、玄米の処理法の検討、確立を進めた。さらに、DPAA 投与ラットの各組織の分析に適用し、手法の適用性の評価を行うとともに、毒性試験の際に 28 日間にわたり反復投与された DPAA の各組織への蓄積状況を明らかにした。

## 2 方法

### 2.1 分離条件

分離には東洋ソーダ株式会社のHPLCカラムTSKgel Super I-AP (4.6mm ×75mm)を用い、標準ヒ素化合物として、DPAA(トリケミカル製、林純薬製並びにJ.Edmonds博士による自家合成物質)、PAA(東京化成、林純薬)のほか、アルセノベタインAsBe、メタンアルソン酸MAA(以上、トリケミカル製)、ジメチルアルシン酸DMAA、ヒ酸As(V)、亜ヒ酸As(III)(以上、和光純薬)の各標準物質を用いた。最終的なカラム分離条件を表1にまとめる。検出にはICP-MS(Agilent社製7500シリーズ)又はLC/MS(Agilent社製LC1100シリーズ+MSD SL)を用いた。また、必要に応じてLC/MS/MS(Applied Biosystems社製API-4000 QTRAP)を用いた。

### 2.2 生物、生体試料中DPAA並びに関連ヒ素化合物の分析のための前処理条件

これまでに、ゲルろ過システムへの適用を念頭に開発、確立された生体試料の前処理方法ではイオンクロマト系のカラムに対して夾雑物による分離の悪化が認められたため、さらに前処理を高度化することとし、以前の前処理法で作成された試料溶液をさらに固相抽出でクリーンアップすることとした。ODS系や活性炭系を含む市販の疎水性カートリッジカラム数種類についてDPAA並びにPAAの添加回収実験を行い、捕集法の最適化を図った。その結果、Waters社製のOASIS HLBカートリッジがPAAの回収率もよく、実試料の処理でも妨害を受けにくい固相抽出カラムとして選定された。最適化された前処理条件を図1にまとめる。

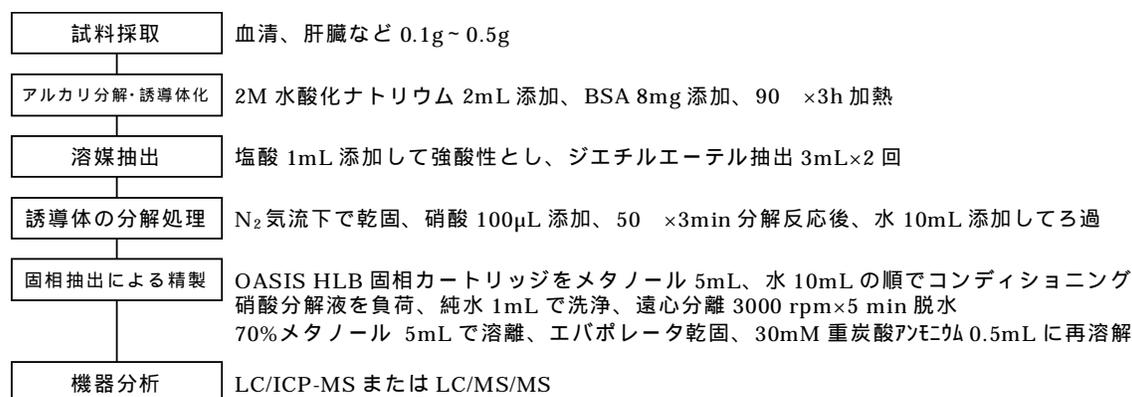


図1 生体試料中DPAA及び関連化合物の分析フロー

## 3 結果

### 3.1 昨年度開発した分析条件

研究の初年度に開発したゲルろ過法は、Asahipak GS220という低分子用ゲルろ過樹脂が有するいくつかの特殊性を利用している。この樹脂はポリビニルアルコールを主体とする親水性樹脂であるが、合成上の理由で表面にカルボキシル基が比較的多く存在するため、アニオン交換作用が分離条件に加わる上に、樹脂に強度を持たせるために二重結合が導入されていることから疎水

性相互作用も有し、結果的に比較的良い分離を達成することができる特徴を有している。しかしながら、主たる分離条件であるゲルろ過は原理的に分離能が高くないため、測定対象物質の増加に伴い、新しい分離条件の確立が必要となった。昨年度も報告したように、そのためイオン交換樹脂系の分離条件について検討を行ったが、シリカゲル系のイオン交換樹脂については良い分離条件を見つけることができず、親水性のポリマーを基材とするイオン交換樹脂についてさらに検討を進めた結果、イオンクロマトグラフ用のLCカラムでDPAA、PAA並びにその他の一般ヒ素化合物との良い分離が短時間で得られるものが見つかり昨年度報告した。初めにも記載したように、新たな分離手法には、ICPMSだけでなくLC/MS、LC/MS/MSとしての利用も期待して開発を進めたことから、分離に使う緩衝液はLC/MSに使える、低濃度の弱酸弱塩基の塩を前提に探索を進め、その結果イオンクロマトグラフ用カラムが適当なものとして見つかった経緯がある。その分離条件を表1に示す。また、併せて最適化されたLC/MS条件を表2にまとめる。

表1 確立された HPLC/ICP-MS、LC/MS、LC/MS/MS 共通の LC 分離条件

---

カラム	: TSKgel Super I-AP (4.6mm × 75mm : 東洋ソーダ ; 同ガードカラムを装着)
緩衝溶液	: 30mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
流速	: 1 mL/min
カラム温度	: 40 度
打ち込み量	: 20 μL

---

表2 LC/MSによるDPAA、PAAの測定条件

---

装置	: Agilent 1100MSD SL (Agilent)
HPLC 条件	: 表1に同じ
イオン源	: APCI ポジティブ並びにネガティブモードを切り替えながら同時測定
ポジティブ	m/z=263 (DPAA)、203 (PAA)、201 (PMAA ; 後述)
ネガティブ	m/z=261 (DPAA)、201 (PAA)、199 (PMAA)
Gas Temp	350 C
Vaporizer	500 C
Drying Gas	13.0L/min
Neb Gas	60 psi
Vcap	2,500V
Vcap	2,500V
Corona	2.0 μA (ポジティブ)
Corona	10 μA (ネガティブ)

---

### 3.2 生体試料の前処理方法の検討

本年確立したイオンクロマトグラフ用カラムは、イオン交換作用を分離の基本とするため、試料溶液中の塩濃度が高かったり夾雑物が多い場合には、分離の位置がずれたりピークの形状が悪化してテーリングを起こすなどの悪影響が生じる。そのため、ゲルろ過を主体とする分離法を対象として開発、確立してきた従来の方法ではうまく前処理ができないケースがあり、新たな分析

手法の確立にあわせて生体試料の前処理方法についてさらに検討、改良を進めた。

これまでの経験から、毛髪及び爪試料についてはアルカリ分解後、酸性側でジエチルエーテル抽出し、エーテル留去後、硝酸処理して水で希釈することにより 60～80%程度の回収率が得られている。したがって、この操作を基本として、さらに夾雑物、塩の除去を試みることにした。そこで、水で希釈した後の水溶液から再度固相抽出して、その過程で夾雑物を除く条件について検討を進めた。DPAA、PAA はいずれも中性付近では解離して負電荷を持っており、かなり親水性の状態になっている。しかしながら夾雑物として塩を考えるとイオン相互作用に対する悪影響が考えられることから、これらの固相抽出にイオン交換性の樹脂は使いたくない。そこで、疎水相互作用を主体と考え、いくつかの固相カートリッジを用いて、解離しなくなる酸性側の pH での抽出を検討した(図2)。その結果、上記の硝酸処理後の酸性水溶液をそのまま OASIS HLB カートリッジに流すことで PAA、DPAA 両者が定量的に保持されることが明らかとなった。また、その後の HLB からの溶出条件についても検討し、最適条件を決定した(図3)。なお、シリカゲルベースの C18 は、シリカゲルが溶けないように酸性度を調整する必要があることから、対象からはずした。HLB に吸着後、試料溶液を洗い流す目的で超純水、あるいは酸性溶液などで洗浄を試みたが、いずれの場合も PAA の吸着が弱くて部分的に洗い流されてしまうことが明らかとなった。そこで、残存試料溶液については遠心して除去する方法をとり、吸着、遠心後、メタノール溶液で DPAA、PAA を溶出する方法をとった。最終的に固まった工程を図4に示す。

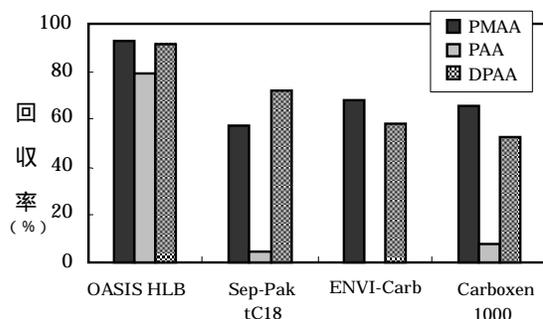


図2 各種固相カートリッジの回収率

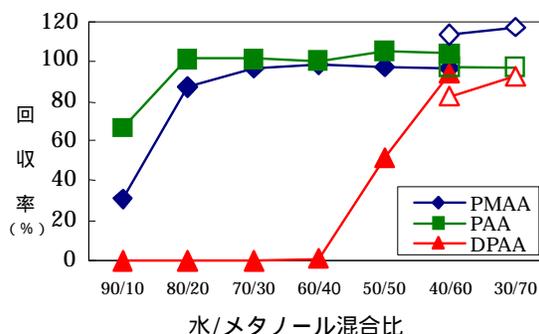


図3 HLB からの各化合物の溶出条件

以前の手法に対して追加したのは、上記で OASIS HLB 吸着以降のステップである。ステップとしては従来よりさらに長くなったが、従来法で作成した酸性溶液をそのまま固相抽出するだけなので、手間としてはそれほど違いはない。国立環境研究所で重金属並びに有機水銀測定用に作成したヒト毛髪標準試料に既知量の DPAA、PAA を添加して上記方法で添加回収試験を行った結果、いずれの物質についても 80%前後の安定した回収が可能であることが示された。

なお、一般の地下水試料の測定に際してはこうした夾雑物の影響を考慮する必要はないと考えられる。実際、従来と同様水試料をそのまま打ち込むだけで、ヒ素として 1 ppb の定量下限を十分達成できた。

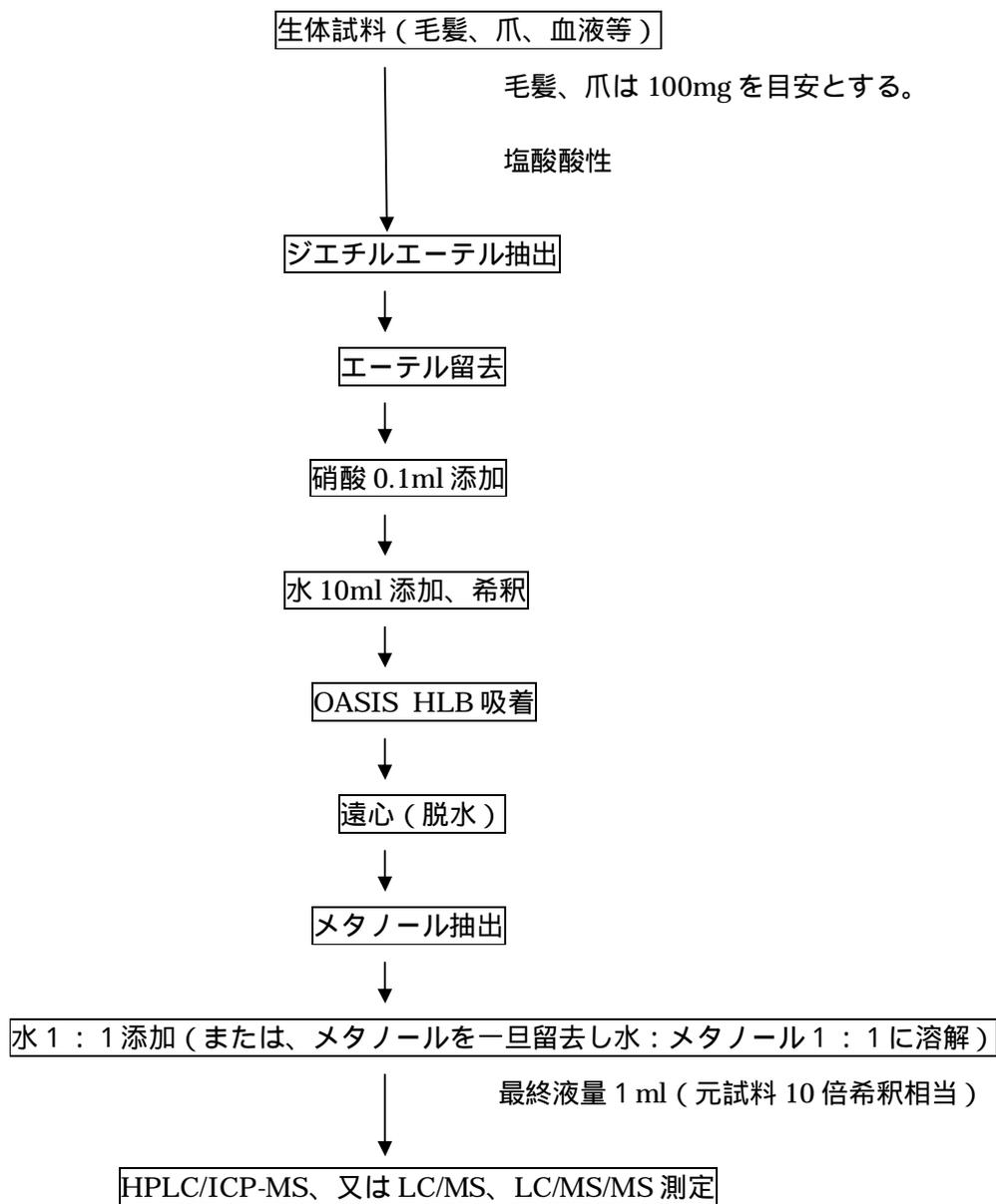


図 4 生体試料の前処理方法の改良

### 3.3 分析精度管理のための玄米均質化試料作製に向けた前処理方法の検討

測定対象物質の増加、測定対象試料の増加に併せて、分析方法も複雑化してきており、今後複数の分析機関による分析の推進に併せて、手法、データの精度管理手法の検討、作製もますます重要となってきている。分析班では東大グループが中心となり、これまでに人毛髪へのDPAA添加試料、DPAA投与ラットの体毛均質化試料の作製と分析検討を進めてきた。今年度は、昨年度の新たなヒ素化合物PMAAの発見に関連し、DPAA等の他にPMAAを多く含む玄米試料を入手してその均質化試料を予備的に作製することとなり、そのための予備分析に参画するための試料前処理方法検討、分析条件検討作業を行った。

生物試料については、これまでアルカリ分解法を主体とする前処理方法を用いてきた。ヒ素化合物は生物体内では還元されたり、生体分子のSH基と相互作用しやすい、といった特徴を有しており、同じ物質でもさまざまに異なった存在状態をとる可能性がある。そのために、抽出にあたって、比較的弱い化学結合までを壊してから前処理を進める必要があると考えられ、そのための方法として有機ヒ素一般に耐性の高いアルカリ分解法を採用してきた経緯がある。しかしながら、でんぷんを主体とする玄米についてはアルカリ分解を行うと融解した状態となってしまう、その後の処理が極めて面倒となる。もう一つよく使われる酸分解についても予備検討を進めたが作業性では問題ないものの、有機ヒ素化合物の分解傾向が認められ、スクリーニング目的には使っても正確な分析のための前処理法としては必ずしも適切ではないと判断された。そこで、本研究では、処理を面倒にする主な要因のでんぷんを、酵素を使って分解する新たな手法について検討を行い、最適化を進めて手法の確立を図った。

酵素としては市販のアミラーゼを用い、市販の白米にDPAAなどの標準を添加した試料で回収率を目安に検討を進めた。DPAA、PAA、PMAAの生物生体試料からの回収率を安定させるためにさまざまな検討を進めたが、毛髪、爪などイオウを含むタンパク質を多く含む物質については比較的よい回収率が得られる一方、タンパク質を余り含まない物質については回収率が低下しやすい傾向が認められた。そこで、試料に純度が高く安価なタンパク質を添加してアルカリ分解して安定した高い回収率を得られる工夫を行い、BSA（牛血清アルブミン）が適した性質を示したことから、添加量の最適化に関する評価を行った。その結果を踏まえ、1試料当たりBSAを8mg米に添加して分析前処理を行うこととした。最終的な条件を表3にまとめる。また、重金属（Cd）分析用に作製された国立環境研究所の標準試料であるNIES-No.10玄米を用いた標準添加回収率試験の結果を表4に示す（下段は玄米そのものの測定結果でいずれのヒ素化合物も検出されない。上段はこれに既知量のDPAA、PAA、PMAAを加えて測定操作を行った結果で、右欄に回収率がまとめられている）。物質により多少の変化はあるが、いずれの物質も70%を上回る良い回収率を示しており、手法として信頼できるレベルに到達していると判断された。なお、DPAAとPAAについては安定同位体レベルの標準化合物がすでに市販され始めており、これらを前処理時に添加して操作を進め、LC/MS/MSないしLC/MSで測定を行うことで、いわゆる同位体希釈法による回収率補正を行った測定を実施することができる。一方、HPLC-ICPMSで測定を行う場合はこの同位体希釈法は使えない。HPLC-ICPMS測定の場合は、原則として測定結果を補正せずにそのまま提示する。

表3 標準添加試料の回収率試験結果

	試料量(g)	定容量(mL)	検液中の濃度(μgAs/L)			回収率(%)		
			PMAA	PAA	DPAA	PMAA	PAA	DPAA
NIES米10-a+PAAs	0.5040	0.5	14.9	16.0	10.2	79.6	86.3	71.2
NIES米10-a(BG)	0.5055	0.5	0.0	0.0	0.0	-	-	-

今後、DPAA他有機ヒ素化合物の分析精度管理のための均質化試料として今年度から来年度にかけて作製する予定の玄米試料について、この手法を適用して分析法の評価と必要な改良を進めるとともに、相互の比較をもとにさらなる分析手法の改良、発展を目指す。

### 3.4 DPAA投与実験動物組織の分析

DPAAの毒性評価のために、毒性試験が行われているが、その試験の中で、28日間反復投与による毒性試験が実施される際に、同一の投与条件でDPAA分析用動物を雄雌3匹ずつ作製してもらい、他の試験動物の解剖時に併せて解剖してその組織を凍結し、国立環境研究所にて保管を続けていた。その中のDPAA、PAA、PMAA濃度の測定を、今回作製した手法で行い、手法の適用性に関する評価を進めるとともに、実際のDPAAなどの分布の様子を明らかにした。

投与量の異なる3段階の動物及び回復群の雄1体ずつにおいて、それぞれの組織ごとの存在量の測定結果を図5に示す。また、脳内DPAAレベルの投与量との関係を図6に示す。

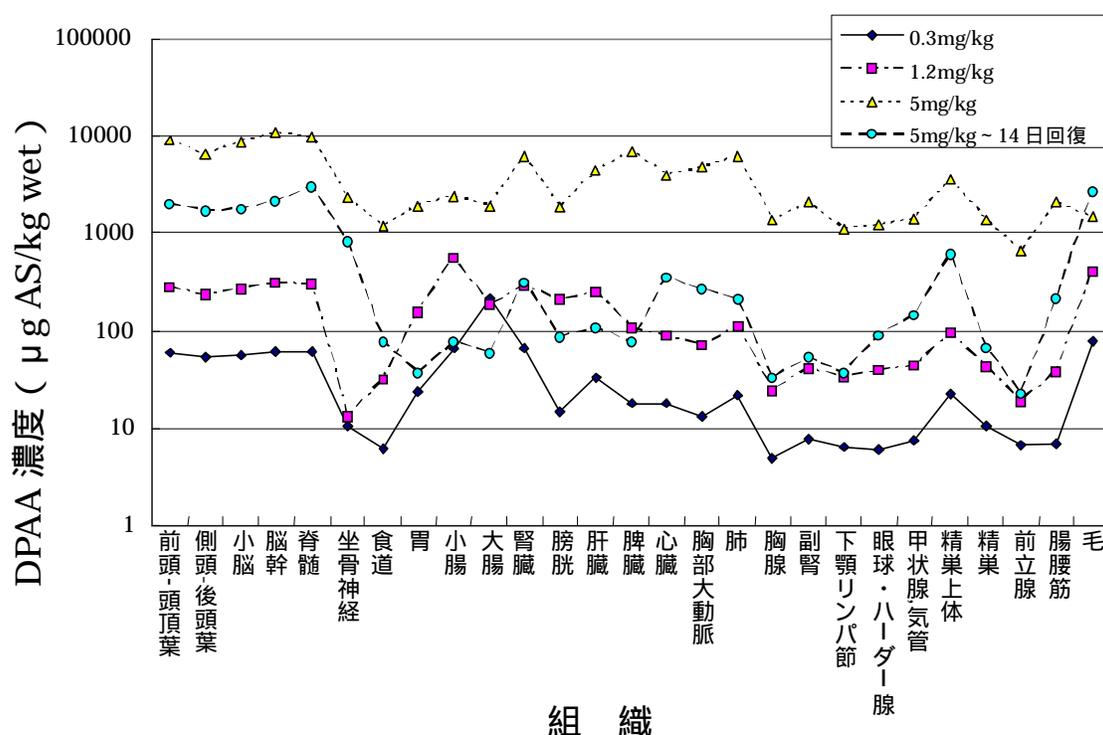


図5 DPAAの28日間反復投与ラットの組織中DPAA分布

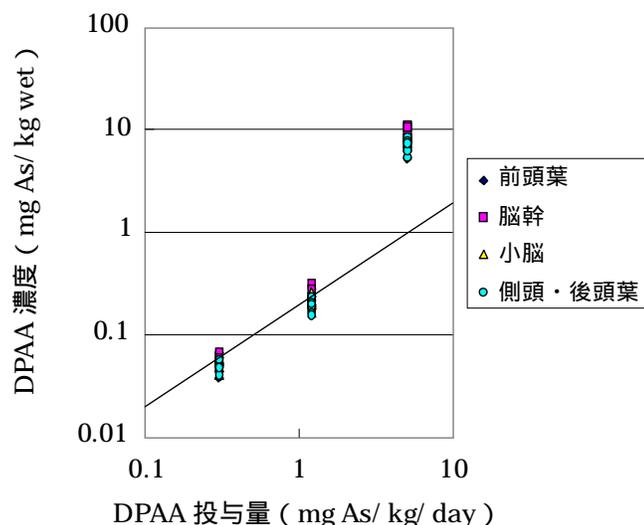


図6 脳内 DPAA 濃度の投与量との関係

実験で使われた投与濃度設定は、0.3mg/kg/day、1.2mg/kg/day、5 mg/kg/day の3段階であった。図5から分かるように、いずれの濃度レベルでも脳内の DPAA 蓄積濃度は体内組織の中でも最も高い水準にあり、血液脳関門を DPAA が容易に通過して脳内に蓄積する様子が見える。他に比較的高い部分としては、投与した DPAA 水溶液の吸収に恐らく関与する小腸、大腸、排泄に関連する腎臓、薬物代謝一般を扱う肝臓などが挙げられる。さらに、投与量が増えると、心臓、肺臓など循環系に関わる組織の濃度レベルが相対的に高くなるように見える。5 mg/kg 投与群において投与終了後 14 日間経過後の濃度低下を見ると、恐らく体外排出により毛の濃度がさらに上昇していることを除くと、脳神経系、並びに精巣上体の濃度低下割合の低いことが目立つ。いずれにしても脳が最も高いレベルにあることは大きな特徴と考えられる。もう一つの重要な特徴は、DPAA の投与量に応じて体内レベルが急増する閾値のようなものが見られる点である。図6は両対数グラフになっているが、この図に示されているように、比較的低レベルの 0.3mg/kg/day、1.2mg/kg/day 投与群までは投与量にほぼ比例して体内（ここでは脳内）蓄積濃度が増加するように見える。一方、その上の 5 mg/kg/day になると、投与量増加に対して、DPAA 濃度は想定される濃度と比較し 1桁高くなっている様子が分かる。この急増傾向は脳だけではなく体内各臓器において見られ（図5）、血液脳関門の話ではなくむしろ体内レベルそのものが急激に増加した結果のように見える。こうした事象を引き起こしたメカニズムについてはまだ不明であるが、排泄系への障害なども視野に入れつつ、今後の研究が待たれる。

DPAA の毒性試験では、0.3mg/kg/day が無影響量（NOEL）として抽出された。一方、その1桁上の 5 mg/kg/day 投与群では、28 日の投与期間中に雄 3 匹（10 匹中）、雌 6 匹（同 10 匹中）のあわせて 9 匹のラットが死亡した。今回のデータから、1.2mg/kg/day 投与と 5 mg/kg/day 投与との間に大きな境界があって、体内蓄積レベルが投与濃度レベル差より 1桁上昇することが分かった。また、DPAA 濃度は脳内で最も高いことも示され、さらに脳内でも脳幹のレベルが一番高いことも明らかとなっている（図5）。脳幹は心拍など生命維持機能に関わっており、今回の結果は死亡動物の死因について一つの手がかりを与えてくれるものと考えられる。なお、測定にあたっては関連化合物である PAA、PMAA の測定も同時に行っており、特に最高投与レベルではこれらも各臓器中の存在が見えてくることが示されている。ただし、これらの濃度レベルは DPAA に比較して遙かに低いこと、また、まだ雄一匹だけの結果であることから、定量的な評価などについては今後のデータの蓄積が待たれる。

今回の測定から、DPAA は血液脳関門を容易に通過して脳内に入り、特に脳幹にたまりやすい傾向を持つ可能性が示された。また、ある種の閾値があり、その値を超えて投与すると体内蓄積レベルが急増する可能性も示された。その場合も DPAA は脳血液関門を通過し、脳内濃度が維持され、おそらくはこのことが投与動物の死因の一つの手がかりを与えてくれるものと考えられた。

なお、投与動物の DPAA 分析については、平成 16 年度に茨城県衛生研究所と石井講師との共同で開始されており、本年度の研究はその継続にあたる。茨城県衛生研究所の測定は LC/MS/MS を用いて DPAA の安定同位体ラベル化合物（サロゲート）の回収率で補正を行っているのに対して、今回の結果は LC/ICPMS によるため、回収率補正のないデータであることに注意する必要がある。投与動物の分析は濃度レベルごとに 5 回に分けて実施し、それぞれの回ごとに回収率測定用の標準添加試料を二つずつ測定しているが、その際の二つの値の平均値の 5 回の測定を通じた平均とばらつきは、DPAA、PAA、PMAA それぞれについて、 $92.3 \pm 3.1\%$ 、 $83.9 \pm 11.4\%$ 、 $98.8 \pm 13.5\%$ であった。平成 16 年度データとの定量的比較のため、さらにサロゲート添加、LC/MS/MS によるデータの集積を継続している。

#### 4 まとめ

これまでの成果を継承しつつ新たなヒ素化合物 PMAA の発見に対応するために、今年度は、昨年度開発した DPAA、PAA、PMAA の新たな分析手法に利用できる生体試料の前処理方法の開発、確立を行った。この手法をベースとして米の前処理方法を開発するとともに、分析精度管理のための玄米均質化試料作製のための予備検討に対して貢献した。さらに、DPAA 投与ラットの各組織中の DPAA 並びに関連化合物の分析を継続し、投与量と体内蓄積量の関係、組織相互の蓄積濃度の違いなどの基礎情報を蓄積した。

#### 参 考 文 献

##### 【誌上発表】

- 1) T. Nakayama, T. Isobe, K. Nakamiya, J.S. Edmonds, Y. Shibata, M. Morita: Complexes of diphenylarsinic acid and phenylarsonic acid with thiols: a  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR study, Magnet. Reson. Chem., in press.
- 2) 上野清一、北村立実、中村美樹、大曾根圭子、柴田康行、石崎睦雄：安定同位体標識化合物を利用する動植物中のジフェニルアルシン酸の高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による定量、分析化学、55、41-44、2006.

##### 【口頭発表】

- 1) 伊藤安紀、伊藤誠治、伊藤智雄、柴田康行、森田昌敏：フェニルヒ素化合物の LC/MS および LC/ICPMS 分析法の検討、第 14 回環境化学討論会、2005、大阪
- 2) 辻野一茂、稲垣知恵、八木孝夫、柴田康行、森田昌敏：LC/MS/MS を用いたフェニルヒ素化合物分析、第 14 回環境化学討論会、2005、大阪
- 3) 伊藤安紀、伊藤智雄、J.S. Edmonds、柴田康行、森田昌敏：生体試料中のジフェニルアルシン酸および関連化合物の分析法の検討、第 12 回ヒ素シンポジウム、2005、岩手



## [ 2.2 ] DPAA 分析手法の精度の向上に関する研究

主任研究者：上野 清一（茨城県衛生研究所遺伝子科学部 部長）

研究協力者：山本 浩嗣（茨城県衛生研究所企画情報部）

### 1 目的

当所ではこれまで、地下水等環境試料中の微量ジフェニルアルシン酸（DPAA）の簡易モニタリング法として、固相抽出法を利用して DPAA を単離、濃縮し、汎用性の高い黒鉛炉原子吸光法（GF-AAS）に供する方法を開発した<sup>1)</sup>。次に、不明とされる DPAA の生体内における動態を解明するために、生体試料中の DPAA 定量法として、生体試料のアルカリ分解液から DPAA を選択的かつ効率よく抽出する前処理法を考案し、GF-AAS に供する方法を確立した<sup>2)</sup>。さらに、農産物中の極微量の DPAA を簡便かつ精度よく測定するため、先に考案した DPAA の前処理法で DPAA を効率よく抽出し、サロゲート物質（DPAA-<sup>13</sup>C<sub>12</sub>）を内部標準とする HPLC/MS/MS に供する方法を確立した<sup>3)</sup>。

本研究においては、茨城県衛生研究所で開発したこれらの分析手法を用いて、東京大学、国立環境研究所が作成した分析精度管理用玄米均質化予備検討試料中の DPAA 濃度を測定し、今後の精度管理用均質化試料の作成や保証値決定作業に資することを目的とする。

### 2 方法

#### 2.1 試薬

DPAA 標準液は、和光純薬製 DPAA 標準品 10mg を精製水に溶解し 10ml とし標準原液とした。この液を用時適宜精製水で希釈して使用した。内部標準液（サロゲート標準液）は、林純薬製 DPAA-<sup>13</sup>C<sub>12</sub> 標準品 10mg をエタノールに溶解し 10 ml とし標準原液とした。この液を用時適宜精製水で希釈して使用した。水酸化ナトリウム溶液（3 mol/l）及び塩酸は、関東化学製の Ultrapur を、クロロホルム及びメタノールは、関東化学製の高速液体クロマトグラフィー用を使用した。その他の試薬、溶媒は市販の特級品を使用した。

#### 2.2 装置及び器具

高速液体クロマトグラフは Agilent1100 シリーズを、質量分析装置は Applied Biosystems 製の API2000 を使用した。アルミブロック恒温槽は、大洋科学工業製の DRY THERMOUNT TAH-2 を使用した。

#### 2.3 測定条件

##### 高速液体クロマトグラフ

分析カラム：ジューエルサイエンス製の Inertsil ODS-3（2.1mmi.d. × 150mm、3 μm）

移動相：A 液（0.1%TFA 水溶液） B 液（0.1%TFA アセトニトリル溶液）

グラジエント条件 B 液 5% から 15 分間のリニアグラジエントで 95%

流量：0.2 ml/min

カラム温度：25

注入量：5 μl

## 質量分析装置

イオン化 : エレクトロスプレーイオン化 (ESI)  
イオンスプレー電圧 : 4.5kV  
イオンソース温度 : 450  
定量用モニターイオン : DPAA (263 151.9) DPAA-<sup>13</sup>C<sub>12</sub> (275 158.0)

## 2.4 定量操作

### 2.4.1 試料の前処理

玄米均質化予備検討試料 (0.2g) を 50ml ネジ口遠心沈殿管に取り、2 M 水酸化ナトリウム溶液 10ml を加え管壁に試料が付着しないように時々激しく振り混ぜながら 90 ° で 2 ~ 5 時間加熱分解した。

### 2.4.2 検液の調製

上記試料のアルカリ分解液に内部標準液 (100 ng/ml) 0.3ml を添加し混和後、クロロホルム 2 ml 及びヘキサン 8 ml を加えて 3 分間振り混ぜ遠心分離 (3,000rpm、5 min) した。有機層を分離し、水層に 2 M 塩酸溶液 17ml を加えて塩酸濃度を約 0.5M に調整し、20% システイン水溶液 2 ml 及び 40% ヨウ化カリウム溶液 2 ml を添加後、混和し 30 分放置した。クロロホルム 10ml を加えて 5 分間振り混ぜ DPAA を有機層に抽出後、遠心分離し下層を分取し、50 ml の共栓遠心沈殿管に綿栓ろ過した。この操作を再度繰り返しクロロホルム抽出液を合した。抽出液を減圧乾固し残留物をメタノール 3 ml に溶解し、孔径 0.2 μm のメンブランフィルターでろ過し検液とした。

### 2.4.3 検量線

DPAA 濃度 5 ~ 40 ng/ml (ヒ素換算値 : 1.4 ~ 11.4 ng/ml) 、サロゲート物質濃度 10 ng/ml の標準液を調製し、その 5 μl を HPLC/MS/MS に供し、DPAA とサロゲート物質とのピーク面積比から検量線を作成した。

### 2.4.4 定量

検液 5 μl を HPLC/MS/MS に供し、検量線から試料中の DPAA 濃度を算出した。

## 3 結果

玄米均質化予備検討試料 2 種類の DPAA 濃度の測定結果を表 1 に示したが、測定値の相対標準偏差は約 5 % 以下と良好な再現性を示し、試料 No.18 及び No.44 の DPAA 濃度は、それぞれ 191.8 ng/g (ヒ素換算値 : 54.8 ng As/g) 及び 195.3 ng/g (ヒ素換算値 : 55.8 ng As/g) とほぼ近似した値が得られた。

表 1 HPLC/MS/MS による試料中の DPAA 濃度測定結果

試料	測定値 (ng As/g)	平均値 (ng As/g)	C.V. (%)
No.18	52.7, 52.8, 55.3, 57.5, 55.7	54.8	3.8
No.44	52.7, 58.4, 53.7, 56.0, 58.2	55.8	4.6

## 参 考 文 献

- 1) 北村立実、上野清一、中村美樹、柴田美也子、貝瀬利一、石崎睦雄：地下水及び海水中の微量ジフェニルアルシン酸の固相抽出 黒鉛炉原子吸光法による定量、分析化学、54、701、2005.
- 2) 上野清一、北村立実、中村美樹、大曾根圭子、石崎睦雄：溶媒抽出及び固相抽出法を用いる生体試料中のジフェニルアルシン酸の選択的分離法と黒鉛炉原子吸光法による定量、分析化学、55、9、2006.
- 3) 上野清一、北村立実、中村美樹、大曾根圭子、柴田康行、石崎睦雄：安定同位体標識化合物を利用する動植物中のジフェニルアルシン酸の高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による定量、分析化学、55、41、2006.



## [ 2.3 ] 環境試料並びに生体試料中のジフェニルアルシン酸の測定法の確立に関する研究

主任研究者：貝瀬 利一（東京薬科大学生命科学部 教授）  
分担研究者：瀬戸 康雄（科学警察研究所化学第四室 室長）  
：高橋 滋（東京薬科大学生命科学部 助教授）  
：太田 敏博（東京薬科大学生命科学部 助教授）  
研究協力者：木下 健司（東京薬科大学生命科学部 大学院生）  
：野口 綾乃（東京薬科大学生命科学部 大学院生）

### 1 概要

平成 16 年度までにジフェニルアルシン酸（DPAA）標準化合物の合成、HPLC/ICP-MS を用いた DPAA の検出法、水並びに土壌試料中の DPAA の分析法、毛並びに爪中の DPAA の分析法の確立を行い、良好な回収率を得ることができた。

平成 17 年度はこれまで確立した HPLC/ICP-MS による検出法を用いて米中のフェニルヒ素化合物の分析法を中心に検討した。イネ葉並びに米について DPAA、フェニルアルソン酸(PAA)、フェニルメチルアルシン酸（PMAA）の添加回収実験を行ったところ良好な回収率が得られ、実試料に応用可能であることが明らかになった。本法を用いて検討したところ神栖産汚染米から DPAA、PMAA のみならず未知ヒ素化合物と思われるピークが検出された。さらにイネ葉からも DPAA、PMAA、さらに未知ヒ素化合物が検出された。また土壌中のフェニルヒ素化合物の動態を明らかとするため土壌微生物による DPAA、PAA の分解試験を行った。

### 2 目的

茨城県神栖市(旧神栖町)においてジフェニルアルシン酸(DPAA)、フェニルアルソン酸(PAA)、フェニルメチルアルシン酸(PMAA)等のフェニルヒ素化合物による健康被害並びに環境汚染が明らかとなったことを受け、環境試料並びに生体試料中フェニルヒ素化合物の迅速かつ高精度分析法について検討することを目的とした。

### 3 方法

#### 3.1 ヒ素標準化合物

ジフェニルアルシン酸（DPAA）、フェニルメチルアルシン酸（PMAA）、フェニルジメチルアルシンオキシド（PDMAO）、ジフェニルメチルアルシンオキシド（DPMAO）はトリケミカル研究所より提供を受けた。フェニルアルソン酸（PAA）はアクロス社製を購入した。ビスジフェニルアルシンオキシド（BDPAO）は林純薬より提供を受けた。

#### 3.2 イネ葉中フェニルヒ素化合物の抽出

神栖産イネの乾燥葉は粉碎した後 0.2 g を量り取り、水：メタノール = 1 : 1 (v/v) 溶液 5 mL に懸濁させた。懸濁液を 60 分間超音波処理し、フェニルヒ素化合物を抽出した。この懸濁液を 5 分間、5,000 rpm で遠心分離し上清を得た。残渣はさらに水：メタノール = 1 : 1 (v/v) 溶液 5 mL に懸濁させ、60 分間超音波処理し、5 分間 5,000 rpm で遠心分離を行い上清を得た。

上清中のメタノールを留去し、硝酸を添加して酸性とした後、固相抽出を行ってフェニルヒ素化合物の濃縮並びに夾雑物の除去を行った。

### 3.3 米中フェニルヒ素化合物の抽出

神栖産米は粉碎した後 0.2 g を量り取り、1 M リン酸溶液 5 mL に懸濁させた。懸濁液を 80 で 60 分間加熱し、フェニルヒ素化合物を抽出した。この懸濁液を 5 分間、5,000 rpm で遠心分離し上清を得た。残渣はさらに 1 M リン酸溶液 5 mL に懸濁させ、80 で 60 分間加熱し、5 分間、5,000 rpm で遠心分離を行い上清を得た。得られた上清 10 mL を用いて固相抽出を行い、フェニルヒ素化合物の濃縮並びに夾雑物の除去を行った。

### 3.4 微生物分解試験

神栖水田土壌 10 g を DPAA 及び PAA を添加した Nutrient Broth 200mL に懸濁し水田土壌微生物を培養した。培養開始から 0、1、2、3、4、5 週目に培養液をそれぞれ採取し、培養液中のヒ素化合物を HPLC/ICP-MS を用いて測定した。なお対照実験は土壌懸濁後にオートクレーブ滅菌を行った培養液を用いた。

### 3.5 ヒ素化合物の固相濃縮法

固相カートリッジ (Aquisis PLS-3) はあらかじめメタノール 5 mL、50%メタノール 5 mL、硝酸酸性にした 2.5 mM テトラメチルアンモニウム (TMA) 溶液 (pH2) 10 mL を用いてコンディショニングし、抽出液を通液した。硝酸酸性 2.5 mM TMA 溶液 5 mL を用いて洗浄した後、乾燥空気を通気して乾燥させた。フェニルヒ素化合物はメタノール 10 mL により溶出した。溶出液は減圧乾固した後、純水 1 mL に溶解し、0.45  $\mu$ m ミクロフィルターを用いてろ過し、その 5  $\mu$ L を HPLC/ICP-MS に導入した。

### 3.6 ヒ素化合物の検出

フェニルヒ素化合物の検出は ICP-MS (ELAN DRC-e) を用いて、As:75 をモニターした。またフェニルヒ素化合物の分離方法は高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いた。これらの装置を組み合わせた HPLC/ICP-MS システムを構築しフェニルヒ素化合物の分離検出装置として用いた。PAA、DPAA、PMAA、PDMAO、DPMAO の分離用カラムの検討並びに ICP-MS 条件を以下の項目にそれぞれ示す。

#### 3.6.1 Inertsil Diol カラムを用いた分離条件の検討

HPLC 用分離カラムは Inertsil Diol (2.1  $\times$  150 mm、5 $\mu$ m) を用いて移動相アセトニトリル : 水 (硝酸で pH1.5 に調整) = 25/75 (v/v) を用いた。

#### 3.6.2 Inertsil CN-3 カラムを用いた分離条件の検討

HPLC の分離用カラムは Inertsil CN-3 (1.5  $\times$  150mm、5 $\mu$ m) を使用し、移動相は 50mM クエン酸緩衝液 (pH5.5) / メタノール / アセトニトリル = 70/20/10 (v/v/v) を用いた。

#### 3.6.3 Inertsil NH2 カラムを用いた分離条件の検討

HPLC の分離用カラムは Inertsil NH2 (1.5  $\times$  250mm、5 $\mu$ m) を使用し、移動相は 20mM リン酸バッファー (pH2.5) / アセトニトリル = 52.5/47.5 (v/v) を用いた。HPLC/ICP-MS の測定条件を表 1 に示した。

表1 HPLC/ICP-MS 測定条件

HPLC	分離条件 1	分離条件 2	分離条件 3	ICP-MS	
Column	Inertsil Diol 2.1 × 150 mm, 5 μm	Inertsil CN-3 1.5 × 150 mm, 5 μm	Inertsil NH2 1.5 × 150 mm, 5 μm	RF power	1.5 kW
Column temp	40	40	Room temperature	Plasma gas flow	18 L/min
Mobile phase	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O(pH1.5) = 25/75 (v/v)	50 mM クエン酸 (pH5.5)/MeOH/CH <sub>3</sub> CN =70/20/10(v/v/v)	20 mM リン酸緩衝液 (pH2.5)/CH <sub>3</sub> CN =52.5/47.5(v/v)	Auxiliary gas flow	1.3 L/min
Flow rate	0.2 mL/min	0.1 mL/min	0.1 mL/min	Nebulizer gas flow	1.1 L/min
Injection volume	5 μL	5 μL	5 μL	m/z	75 (As)

#### 4 結果及び考察

##### 4.1 HPLC/ICP-MS によるフェニルヒ素化合物の溶出条件の検討

###### 4.1.1 Inertsil Diol カラムを用いた分離条件

Inertsil Diol を分離用カラムとして用いて検討した結果、PMAA、PAA、DPAA は3分（180sec）以内で溶出され、それぞれ分離可能であった。標準品の HPLC/ICP-MS クロマトグラムを図1に示す。検量線は1 ngAs/mL から 10<sup>3</sup> ngAs/mL の範囲で直線性を示し、広いダイナミックレンジを有していた。検出限界は0.5 ngAs/mL であった。また同条件でBDPAOの分離検出も可能であった。しかしながらPAA、DPAAがメチル化を受けたと推定されるPDMAO、DPMAOとの分離が不十分であった。以上の結果より本法はフェニルヒ素化合物の迅速かつ高感度検出法として適していることが確認された。

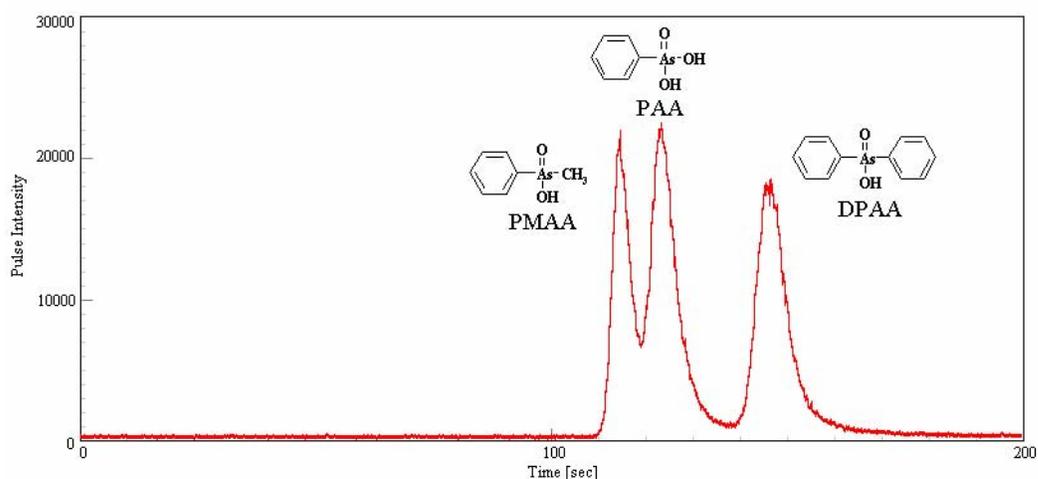


図1 Inertsil Diol カラムを用いた標準品の HPLC/ICP-MS クロマトグラム

#### 4.1.2 Inertsil CN-3 カラムを用いた分離条件

Inertsil CN-3 を分離用カラムとして用いて検討した結果、PAA、PMAA、PDMAO、DPAA、DPMAO は4分以内で溶出され、それぞれ分離可能であった。この分離カラムは疎水性の比較的高いヒ素化合物の分離に応用可能であった。標準品の HPLC/ICP-MS クロマトグラムを図2に示す。

また溶離液のアセトニトリル濃度を高めることにより疎水性の高いBDPAOも10分(600sec)以内に分離検出が可能であった。しかし主に尿等の生体試料に含まれるアルセノベタイン、ジメチルヒ素、無機ヒ素はPAAの保持時間付近に検出され分離不可能であった。実試料では固相抽出によって試料液中のメチル化ヒ素、無機ヒ素を除去する、もしくはPAAについて別の溶離条件で測定を行う必要がある。以上の結果より本法は代謝により疎水性が高まったヒ素化合物の測定に適しており、糞中ヒ素化合物の測定への応用が考えられた。

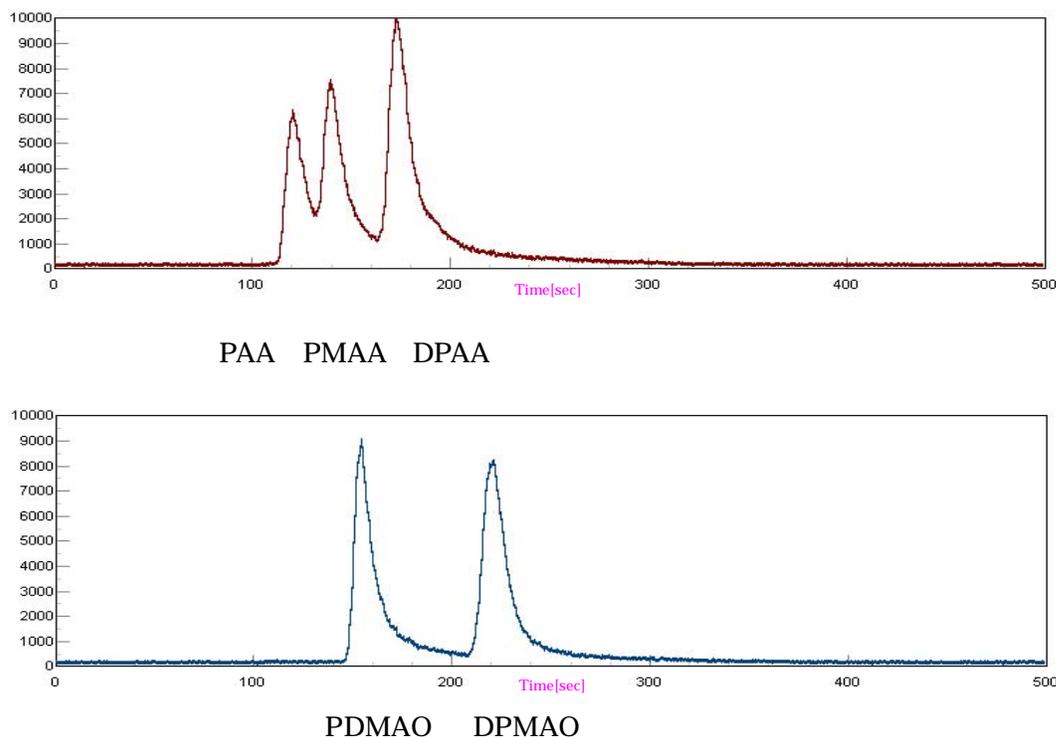


図2 Inertsil CN-3 カラムを用いた標準化合物の HPLC/ICP-MS クロマトグラム

#### 4.1.3 Inertsil NH2 カラムを用いた分離条件の検討

Inertsil NH2 を分離用カラムとして用いて検討した結果を図3に示す。この分離カラムでは親水性の高いヒ素化合物の分離に応用可能であった。尿等の生体試料において検出されるアルセノベタイン、ジメチルヒ素、無機ヒ素等との分離が可能であった。また保持時間200sec以前に陽イオン性化合物が、200sec付近には疎水性の高いものが、200sec以後は陰イオン性化合物が検出された。しかし疎水性の高い成分については分離が不十分であり、上記 Inertsil CN-3 カラム等での測定が必要である。また現状での欠点として感度が低いことが挙げられた。以上の結果から本法は親水性の比較的高いヒ素化合物の分離に適しており、尿中ヒ素化合物の測定への応用が考えられた。また未知化合物が検出された場合にその保持時間から、化合物の有する性質について適格な予想が可能であることが示唆された。

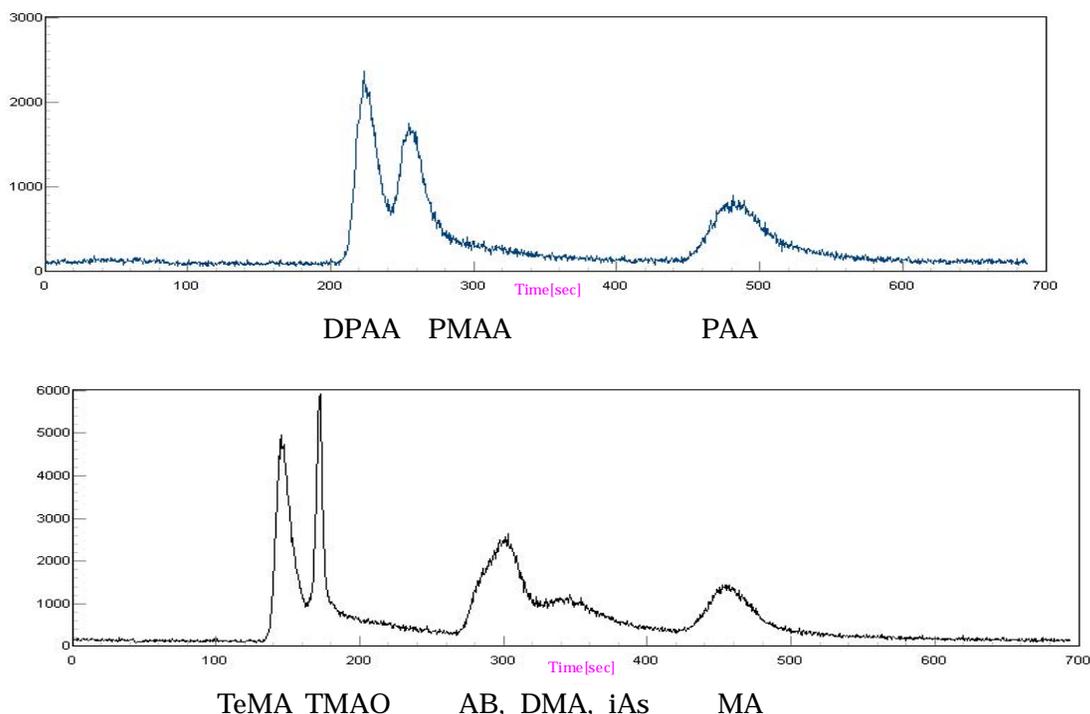


図3 Inertsil NH2 カラムを用いた標準品の HPLC/ICP-MS クロマトグラム

#### 4.2 固相抽出

固相抽出を用いて添加回収試験を行った結果、DPAA、PAA、PMAA はそれぞれ 98.3、96.7、88.4 %の回収率が得られ、満足できる結果が得られた。また本操作を行うことで無機ヒ素、メチル化ヒ素が除去され DPAA、PAA、PMAA 測定中に無機ヒ素ピークによる妨害は観察されなかった。実試料の測定においても添加回収試験と同様の結果が得られたことから本法が、DPAA、PAA、PMAA の同時濃縮法として適していることが確認された。

#### 4.3 イネ葉中フェニルヒ素化合物の抽出

イネ葉を用いて添加回収試験を行った結果、DPAA、PAA、PMAA はそれぞれ 97.1、73.8、128.7 %と良好な回収率が得られたことから、本法がイネ葉中 DPAA、PAA、PMAA の分析法として適していることが示唆された。本法を用いて神栖イネ葉を分析した結果、PMAA の他に複数の未知ヒ素化合物が高濃度で検出された。未知ヒ素化合物は標準物質の  $R_t$  から DPMAO、PDMAO と推測され、DPAA、PAA は土壌微生物もしくはイネ中でメチル化を受ける可能性が示唆された。

#### 4.4 米中フェニルヒ素化合物の抽出

イネを用いて添加回収試験を行った結果、DPAA、PAA、PMAA はそれぞれ 78.7、84.9、106.2 % 回収と良好な回収率が得られたことから、本法が米中 DPAA、PAA、PMAA の分析法として優れていることが示唆された。本法を用いて神栖産米を分析した結果、PMAA が高濃度に検出され、さらに未知ヒ素化合物が検出された。また DPAA は低濃度で検出された。未知ヒ素化合物は標準物質の  $R_t$  から DPMAO と推測された。米中から検出されるフェニルヒ素化合物はイネ葉中から検出されるフェニルヒ素化合物とパターンが異なっており、イネ部位によってヒ素化合物の代謝に差があることが示唆された。

#### 4.5 微生物分解試験

DPAA を添加した培養液で土壌を加えてインキュベートした場合、DPAA は1週間目までに実験開始時の60%以下まで減少し、2週間目以降は緩やかに45%程度まで減少した。DPAA の減少に伴い培養液中の未知ヒ素化合物の割合が増加した。しかし培養液中の総ヒ素量は減少した。また PAA を培養液に添加してインキュベートした場合、培養液中の PAA は1週間目で開始時の45%程度まで減少し、2週間目では15%、その後は緩やかに10%程度まで減少した。DPAA の場合と同様に PAA の減少に伴って培養液中の未知ヒ素化合物の割合が徐々に増加したが、総ヒ素量が減少した。しかし対照実験では培養液中の DPAA、PAA の増減、未知ヒ素化合物、培養液中ヒ素量の増減は観察されなかった。

以上の結果より DPAA、PAA が水田土壌微生物によって代謝変換される可能性が示唆された。培養液中の総ヒ素量が減少した理由として DPAA、PAA の分解生成物が土壌に吸着した可能性、分解生成物が HPLC/ICP-MS の分離用カラムに吸着された可能性、また分解生成物が揮散性の化合物であった可能性が考えられた。

#### 参 考 文 献

##### 【発表論文】

- 1) Kinoshita K., Shida Y., Sakuma C., Ishizaki M., Kiso K., Shikino O., Ito H., Morita M., Ochi T. and Kaise T. : Determination of diphenylarsinic acid and phenylarsonic acid, which were degradation products of organoarsenic chemical warfare agents, in well water by HPLC/ICPMS system, Appl. Organomet. Chem, 19, 287-293, 2005.
- 2) 北村立実、上野清一、中村美樹、柴田美也子、貝瀬利一、石崎睦雄：地下水及び海水中微量ジフェニルアルシン酸の固相抽出 - 黒鉛炉原子吸光法による定量、分析化学、54、701-705、2005.
- 3) 貝瀬利一、木下健司：地下水から検出された有機ヒ素化合物の分析とその毒性、ぶんせき、No6、284-290、2005.
- 4) Ochi Takafumi, Kinoshita Kenji, Suzuki Toshihide, Miyazaki Kouichi, Noguchi Ayano, Kaise Toshikazu : The role of glutathione on the cytotoxic effects and cellular uptake of diphenylarsinic acid, a degradation product of chemical warfare agents, Arch. Toxicol., in press

##### 【学会発表】

- 1) Kenji Kinoshita, Toshikazu Kaise : The determination of Arsenic compounds derived from Abandoned Chemical Weapons, NBC, 2005/6, Chiba
- 2) 野口綾乃、木下健司、伊藤裕康、森田昌敏、貝瀬利一：土壌微生物によるジフェニルアルシン酸の分解および土壌中ジフェニルアルシン酸、フェニルアルソン酸の検出法の検討、第14回環境化学討論会、2005/6、大阪
- 3) 木下健司、貝瀬利一：遺棄化学兵器由来ヒ素化合物の分析法の検討、第16回日本微量元素学会、2005/6/30～7/1、京都
- 4) 平勝徳、野口綾乃、貝瀬利一：フェニルヒ素化合物のイネへの生育阻害、第11回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会、2005/9、東京
- 5) 市川覚士、木下健司、貝瀬利一：ルイサイト分解生成物 (CVAA) 及びアダムサイトの分析の検討、第12回ヒ素シンポジウム、2005/11、盛岡
- 6) 野口綾乃、木下健司、平勝徳、楡井久、貝瀬利一：環境中のフェニルヒ素化合物の分析、第12回ヒ素シンポジウム、2005/11、盛岡

- 7) 木下健司、貝瀬利一：化学剤分解生成有機ヒ素化合物の分析法の検討、第 12 回ヒ素シンポジウム、2005/11、盛岡
- 8) Kenji Kinoshita, Ayano Noguchi, C. Sakuma, Y. Seto, Toshikazu Kaise : Determination of arsenic compounds derived from chemical warfare agents, The 2005 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2005/12, Hawaii



## [ 2.4 ] 環境試料中DPAA及び関連有機ヒ素化合物分析の精度管理用 均一試料の作成

主任研究者：吉永 淳（東京大学新領域創成科学研究科 助教授）

### 1 概要

分析の信頼性確保にはいくつかの方法があるが、最も効率的かつ現実的なのは、認証標準物質（certified reference material、CRM）を使用した方法である。CRMは、実際に分析する試料と同様の主成分組成を持ち、かつそこに含まれる分析対象成分濃度が既知（認証値）であるような試料である。実試料を分析する際に、CRMも同様に前処理及び測定し、その測定値と認証値とが与えられた不確かさの範囲内で一致することを確認することで、実試料分析の信頼性を担保する。

DPAA関連有機ヒ素化合物分析はまだ広く一般に行われていないために、こうしたCRMがまだ整備されていない。一方で、これら有機ヒ素化合物については、その分析値が社会的にも非常に大きな影響力を持つ可能性があり、そのためにも分析値の信頼性を評価する手だてが必要不可欠である。

### 2 目的

本研究では、各種 DPAA 関連有機ヒ素化合物の環境・食品分析を念頭におき、その分析値の信頼性担保のための材料として、汚染地域で栽培・収穫された玄米試料をもとに「共通試料」を作製することを目的とした。

### 3 方法

#### 3.1 粉砕条件の検討

玄米試料の粉砕に用いたのはフリッチュ社（ドイツ）製ロータースピードミル P-14 である。微量金属類の汚染防止を考慮して、試料と接触する部分はすべてチタン製あるいはテフロン製とした。粉砕ブレードは 12 刃、スクリーンのメッシュサイズは 200 ミクロンである。ブレードの回転速度（装置付属のデジタル目盛り）を 5、10、15、20 と変えて粉砕状況を確認した。

#### 3.2 ふるい条件の検討

粉砕後の試料の均一化の一方策として、粉砕試料をさらにふるいをういて粒度をそろえるが、その際のふるい振動条件を検討した。

#### 3.3 玄米共通試料の作製

神栖地域で栽培・収穫され、食用に供されないまま保管されていた玄米 10 種類を各 75g ずつ、計約 750g を粉砕した。それぞれの玄米試料は国立環境研究所における予備分析によって異なる有機ヒ素含有量（PMAA、MPAA、DPAA）であることが確認されている（表 1）。

上記 3.1、3.2 で確立した粉砕・ふるい方法により、合計 700g の玄米粉末を得た。それらを 5 L のポリプロピレン製円筒型容器に入れ、ボールミル架台上で回転させて粉末を均一化した。均一化した粉末は、1 本当たり約 15～16 g ずつ、計 47 本の褐色瓶に分注した。

表1 玄米試料の有機ヒ素含有量予備分析結果 (µg As/kg)

試料 ID	PMAA	MPAA	DPAA
1	307.9	3.8	20.6
2	110.4	4.3	27.4
3	122.5	2.0	21.7
4	177.6	2.4	37.4
5	114.8	1.6	38.9
6	118.1	1.1	33.5
7	108.4	1.9	35.2
8	1086.0	5.1	50.1
9	132.3	2.1	23.5
10	410.7	4.9	23.8

## 4 結果

### 4.1 玄米粉末の調製について

玄米など比較的硬い試料を、金属類の汚染のないように粉砕して均一な微粉末を作成することは、試料を粉砕する従来の方法(ボールミルなど)を用いる限り困難であることが知られている。したがって本研究で目的とする玄米共通試料の作製においては、玄米粉末の作製が最も重要な課題の一つとなった。

ロータースピードミルを用いた粉砕を最適化した条件を表2に示した。この方法により、200ミクロンのスクリーンを通過して回収できる玄米粉末はほぼ100%の効率であった。しかし粉砕条件が過酷すぎるためか、2~3回運転すると装置が過熱するために、適宜15分程度のインターバルをおき装置を冷却する必要があった。結果的に、1時間に約300gの玄米粉末を得ることが可能であった。

粉砕して得られた玄米粉末を均一化するために、ふるいを使用した粒度の調整を行った。玄米粉末は200ミクロンのスクリーンを通過したものであったので、150ミクロンのふるいを用いてより粒度を下げ、均一化を容易にすることを計画した。ふるいの過程で微量金属の汚染がないようにポリプロピレン製のふるいを用いたので、ふるい作業に伴う静電気によって、ふるいを通過する玄米粉末の回収率はばらついた。結果的には表2に示すようなふるい振とう条件によって約70%の回収率で150ミクロン未満の玄米粉末を得ることが可能であった。電磁式ふるい振とう機を3台併用することで、1時間当たり約400gの玄米粉末(150ミクロン未満)を得ることができる計算である。

以上より、ロータースピードミル1台・電磁式ふるい振とう機3台と表2に示した粉砕・ふるい条件を用いて、1時間当たり約100gの玄米微粉末を作製できる(粉砕試料300g/時間×70%ふるい回収率=200g/時間)こととなった。

表2 玄米粉末調製用の最適な粉碎器・ふるい条件

粉碎装置・条件	
装置	ロータースピードミル P-14 (フリッチュ社)
ブレード	12 刃 (チタン製)
スクリーン	200 ミクロン (チタン製)
受け皿	テフロンコート
ブレード回転速度 (目盛り)	20
一回粉碎重量	100g
冷却時間	約 15 分
ふるい条件	
装置	電磁式ふるい振とう機 A-3 (フリッチュ社)
開き目	150 ミクロン (ポリプロピレン製)
振とう強度	2.5
振とう時間	15 分/50 g
振とう方法	5 sec インターバル、6、5、4 分ごとにふるいの目詰まり対策

#### 4.2 玄米共通試料共同分析結果

均一化し、瓶に分注した玄米共通試料は、有機ヒ素化合物分析に造詣の深い5機関に送付し、PMAA、MPAA、DPAAの共同分析を開始した。結果を表3に示した。DPAAは0.05~0.06 mg As/kgで、PMAAは0.4 mg As/kg付近で、ほぼ一致した結果が得られた。

今後も共同分析を継続し、各種前処理法に基づく分析値の比較などを通し、信頼できる有機ヒ素化合物濃度の参考値を策定することを予定している。

表3 玄米共通試料の共同分析結果 (濃度は mg As/kg、乾燥重量あたり)

	Lab 1-1	Lab 1-2	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lab 5
前処理	水-メタノール抽出	1Mリン酸加熱	アルカリ分解/ 知味仏抽出 (KI+システイン)	アルカリ分解/ I-テル抽出	温水抽出	アルカリ分解/ I-テル抽出
分析法	LC-ICP-MS	LC-ICP-MS	LCMS/MS	LCMS/MS	LCMS/MS	LCMS/MS
定量法	検量線	検量線	同位体希釈	同位体希釈	同位体希釈	同位体希釈
水分含有量%	NA	NA	NA	9.6%	13%	NA
DPAA	0.0461	0.0358	0.061	0.052	0.075	0.068
MPAA					0.022	0.013
PMAA	0.464	0.455		0.38	0.53	0.37
T-As	0.560	0.491		(0.4)	0.62	

水分含有量未測定機関は9.7%水分含量として乾燥重量あたりに換算。