

# I 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	生物試料中ジフェニルアルシン酸 (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	ジフェニルアルシン酸 (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 (DPAA) 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	環境試料中ジフェニルアルシン酸 (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

### 【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た。

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ったことがなく、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、DPAA 並びに関連化合物を迅速、高感度かつ信頼性の高い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、2 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。さらに 3 年目には複雑な組成をとる農作物中の DPAA 及びフェニルメチルアルシン酸 (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。これらを背景として本年度はさらに各種環境試料、生体試料中の DPAA 並びに関連化合物の分析法の確立、応用に関する研究を継続するとともに、昨年度検討した玄米試料のうち濃度レベルの異なる 2 種類を選んで大量に均質化し、班員並びに外部の研究者の参画も得て DPAA 並びに関連化合物の分析を実施し、相互比較を進めた。

#### 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] 生物試料中ジフェニルアルシン酸 (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：田中 敦 (国立環境研究所 主任研究員)  
梅津 豊司 (国立環境研究所 主任研究員)  
今井 裕恵 (国立環境研究所)  
石井 一弘 (筑波大学人間総合科学研究科 講師)  
細谷 朋子 (筑波大学人間総合科学研究科)  
吉兼 光葉 (株式会社環境研究センター)  
伊藤 安紀 (株式会社いであ)  
伊藤 智雄 (株式会社島津テクノリサーチ)  
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が多い。類縁化合物である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。また、その後、複数のメチル化フェニルヒ素化合物も見つかり、環境中において、おそらく生物活動による化学形態の変化が起きている様子が次第に明らかにされてきている。

こうした状態を背景として、昨年度はイオンクロマトグラフィーを基礎とする新たな一斉分析法を生体試料に適用するための前処理法の検討、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、ジフェニルアルシン酸 (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 目的

本年度は、これまでの研究成果を継承し、昨年度に予備検討を行った玄米均質化試料の作成と DPAA をはじめとする各種ヒ素化合物濃度の共同測定作業に参加するとともに、DPAA 等の投与実験動物中に残るヒ素化合物濃度の測定作業を筑波大学と共同して継続した。また、投与動物中の有機ヒ素化合物の *in situ* 測定法の開発に関する予備的な検討として、代謝、体内動態、蓄積などに関する情報取得のための新たな高感度分析技術として注目されるマイクロダイアリス法と組み合わせて使うための微小試料の高感度測定技術であるマイクロ LC との結合に関する検討を進めた。

### 3 方法

#### 3.1 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 (4.6mmφ×75mm) 又はPhenomenex社製Gemini (C<sub>18</sub>カラム4.6x250mm) 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)、PMAA (J.Edmonds博士合成)、フェニルアルソン酸 (PAA) (東京化成製、林純薬製) のほか、アルセノベタイン (AsBe)、メタンアルソン酸 (MMAA) (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) (和光純薬製) の各標準物質を用いた。検出には、HPLC-ICP-MS (Agilent社製7500シリーズ+Agilent LC1100) 又はLC/MS/MS (Applied Biosystems社製API-4000 QTRAP+Agilent LC1100) を用いた。なお、マイクロLCはGLサイエンス社製MP711ポンプをナノLCインターフェースを介してAPI-4000 QTRAPに接続して用いた。

#### 3.2 前処理方法

生物試料のうち、DPAA投与ラット組織の前処理は、昨年度までに開発したアルカリ分解-ジエチルエーテル抽出-硝酸処理-固相抽出法<sup>1)</sup>を採用した。玄米は、昨年度検討したアルカリ分解とアミラーゼ処理を組み合わせた方法を基礎としてさらに検討を進めた。結果として、アミラーゼ処理を先に実施し、溶液化したところで牛血清アルブミンを投与してからアルカリ分解を実施し、以下有機溶媒抽出-固相抽出を組み合わせた手法を確立した。

25mlのポリプロピレン製遠沈管に水2mlとDPAA、PAAサロゲート溶液 (それぞれ50µg As/L) 0.2mlを加え、これに玄米粉末試料0.25gを加えて90℃、30分加熱後、放冷してから3%α-アミラーゼ溶液0.2mlを加えて70℃、15分加温する。放冷後、4N NaOH 2ml並びに10%アルブミン溶液0.2mlを加え、90℃、3時間加熱分解、放冷後、pH<1に調整し、ジエチルエーテル抽出を行う (4ml×2回)。エーテル相をとって乾固後濃硝酸0.1mlを添加し管壁を洗い、水4.9mlを加えて溶解後、コンディショニングした固相抽出カートリッジ (OASIS HLB:ウォーターズ) に吸着させ、水洗浄後、水：メタノール=3：7で押し出し、減圧乾固してから水1mlに溶解し、LC/MS/MSで測定を実施する。なお、HPLC-ICPMSで測定する場合は、同位体ラベルサロゲートは加えずに前処理を実施し、回収率については別に既知濃度の標準溶液について同じ操作を行って回収率の平均値を求め、実試料のデータをその見かけの平均回収率で補正した。

### 4 結果

#### 4.1 玄米測定結果

玄米の前処理方法は基本的に昨年度検討した (1) アルカリ分解法、(2) 牛血清アルブミン添加法、(3) アミラーゼ処理法の組み合わせと、これまで生物試料処理法として確立、使用してきたアルカリ分解後のジエチルエーテル抽出、硝酸処理、固相抽出法の組み合わせを用いたが、最初のアルカリ分解の際に粘性の高い溶液になりやすく、その後の処理が必ずしもスムーズにいかない欠点を有していた。今回、玄米粉末をいったん加熱溶解後、アミラーゼ処理を先に行ってからアルカリ分解を行う順序に改めたところ、処理効率が向上した。また、アルカリ分解の際にアルブミンを加えることでその後の有機溶媒抽出の効率向上が認められ、結果的に良好な回収率を得ることができた。

玄米中の元素測定用標準試料であるNIES No.10A玄米を用い（DPAA並びに関連フェニルヒ素化合物が存在しないことは確認済み）、これに既知濃度のDPAAを標準添加して回収率を求めた結果を表1にまとめる。アルブミン添加、無添加のそれぞれの条件でアルカリ分解以下一連の前処理操作を行った結果、アルブミン無添加では平均してDPAA 69%、PAA 61%、PMAA 76%の回収率であったのに対して、アルブミン添加処理ではDPAA 93%、PAA 91%、PMAA 87%と良好な回収率を示した。

表1 アルカリ分解時のアルブミン添加、無添加によるDPAA等回収率の変化  
(DPAA、PAA、PMAAはいずれもヒ素として20 $\mu$ g/gの濃度になるよう添加した)

	測定値 ( $\mu$ g As/g)			回収率 (%)		
	DPAA	PAA	PMAA	DPAA	PAA	PMAA
アルブミン無添加1	14.36	12.11	15.52	72	61	78
アルブミン無添加2	13.41	12.10	15.02	67	61	75
アルブミン無添加3	13.78	11.50	14.78	69	60	74
平均	13.85	11.90	15.11	69.3	60.7	75.7
アルブミン添加1	18.36	18.03	17.09	92	90	85
アルブミン添加2	18.76	18.52	17.27	94	93	86
アルブミン添加3	18.46	18.13	18.21	92	91	91
平均	18.53	18.23	17.52	92.7	91.3	87.3

玄米粉末均質化試料は、昨年度の予備検討の結果をもとに、濃度の濃いものと薄いものの2種類が作製された（吉永班員の項参照）。水分含有量は薄い方で11.4%、濃い方で10.5%と測定された。HPLC-ICPMSを用いて、上記の標準試料添加回収試験の結果をもとに回収率補正を行ったあとのデータを表2にまとめる。

表2 玄米均質化試料のDPAA等測定結果の平均値（回収率並びに水分含有量を補正済み）

	DPAA	PAA	PMAA	(濃度はいずれも $\mu$ g As/g)
Low	64	9.2	200	
High	140	13	1700	

LC/MS/MS によるDPAAのサロゲート添加・回収率補正の実験を実施した結果は、低濃度試料で68、高濃度試料で140  $\mu$ g As/gであり、表2のLC/ICPMS測定結果と整合的であった。

#### 4. 2 DPAA投与ラット臓器の分析

DPAA毒性試験の際に28日間反復投与を行った雄雌3匹ずつの臓器について、アルカリ分解法に基づくDPAAの分析を継続した。昨年度は各濃度（投与量として、0、0.3、1.2、5mg DPAA/kg/dayの4段階、並びに最高用量投与後2週間回復後の個体のあわせて5種類）雄1体について、肝臓、腸腰筋、胃、腎臓、副腎、脾臓、心臓、胸部大動脈、胸腺、眼球・ハーダー腺、甲状腺、気管、

肺、精巣、前立腺、膀胱、下顎リンパ節、坐骨神経、小腸、大腸、食道、精巣上体、脊髄、毛のあわせて24種類の臓器・組織についてHPLC/ICPMS測定、並びにサロゲートを添加した後前処理を行ったLC/MS/MS 測定の2種類の測定を実施し、データの比較検討並びに臓器別の分布を解析した<sup>1)</sup>。今年度は引き続き雌1体について同じ実験を進め、データを得た。さらに、雄、雌の残り合計18体（実験中の死亡個体を除く）について、比較的濃度レベルの高い脊髄、坐骨神経、肝臓、腸腰筋、腎臓、脾臓、肺の7種について前処理作業を継続している。まだすべての測定が終了しておらず、データが出そろった段階で、今後雄雌の性差や部位ごとの違いなどに関する詳しい解析を行う予定である。

#### 4. 3 マイクロダイアリシスのためのマイクロLC/MS/MS 分析についての検討

DPAA投与ラットではDPAAが血液脳関門を通り抜けて脳に分布することが明らかとなった。DPAAの体内、脳内動態をさらに詳しく解析するためには、より短時間の時間変化を、できれば生きた動物で追跡できる技術が必要である。このような手法の一つとして、マイクロダイアリシス法がある。

マイクロダイアリシスでは、低分子を通過する透析膜を先端に張った細い針を体内、脳内に固定し、体内を動く分子の一部を透析膜を介して外部に取り出し分析を行う。特に脳内のさまざまな化学物質の変化を知るために貴重な手法であり、神経伝達物質の変動などの解析に用いられてきた実績を有する。しかしながら、採取できる試料量は限られており、また濃度レベルも極めて低いと想定されることから、脳内物質の検出には微量のサンプル中の対象物質を極めて高感度に測定可能な分析手法の確立が欠かせない。

ここではこのマイクロダイアリシスへの応用を念頭に置き、少ない試料量に対して高い感度でLC/MS/MS 測定の可能な技術としてマイクロLC/MS/MS システムに注目し、基礎的な技術的検討を進めた。

マイクロLC/MS/MS分析は、マイクロ・ナノLC用インターフェースを装着したApplied Biosystems社製タンデム質量分析装置、API-4000 QTRAPに、GLサイエンス社製マイクロLCポンプMP-711を結合して実施した。装置の外観を図1に示す。

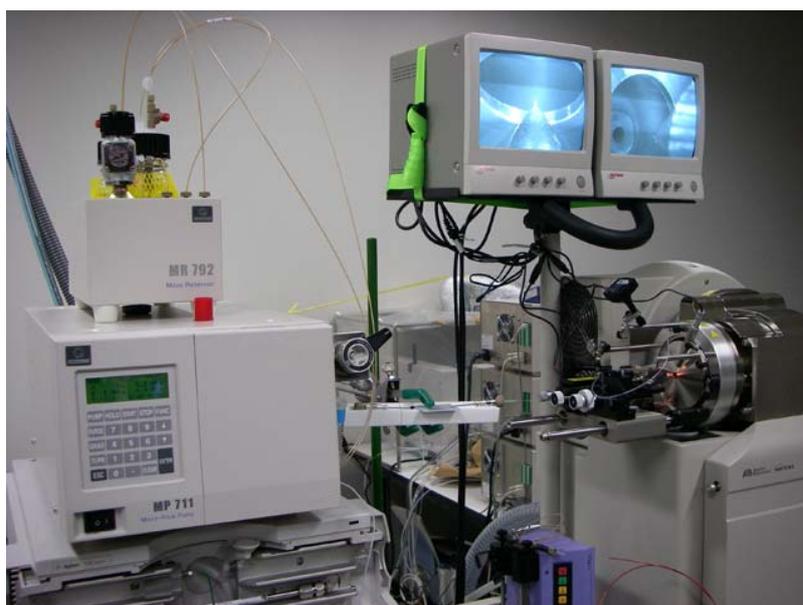


図1 マイクロLC/MS/MSシステムの外観

左側がマイクロLCポンプで、その右側、白い発泡スチロールのトレイにのせたマイクロLCカラム (L-column(3 $\mu$ m) C18 0.2x150mm) を通過した溶離液がその右のナノLCインターフェースに導入される。右側上部に並ぶ2台のモニターは、インターフェースのプロープ位置調整用のものである。これまでに、大きく4種類のDPAA測定方法を開発してきた (表3)。

表3 これまで開発した主なDPAA測定方法と感度の目安

	LC条件	DPAA検出法	試料溶液中DPAAの検出限界*
HPLC/ICPMS	低分子ゲルろ過	ICPMS	~0.1 ng As/ml (10~20 $\mu$ l)
HPLC/ICPMS	イオンクロマト	CPMS	~0.1 ng As/ml (10~20 $\mu$ l)
LC/MS/MS	イオンクロマト	MSMS(ESI)	~0.1 ng As/ml (10~20 $\mu$ l)
LC/MS/MS	ODS	MSMS(APCI)	~0.001 ng As/ml (10~20 $\mu$ l)

\*: 定量限界はそれぞれ1桁程度高くなる

最初のゲルろ過カラムを用いるHPLC/ICPMSは最も早く作成したもので<sup>2)</sup>、生体試料を含むさまざまな試料中DPAAの定量を1試料あたり7分で終わることができ、1日100試料測定を毎日繰り返すこともできる能力を有していた。その後PMAAが発見されるに至り、このゲルろ過法ではPMAAとPAAの分離が困難であったことから、これら3種類並びにその他の主要な無機、有機ヒ素化合物の相互分離が可能なイオンクロマトカラムを用いた手法 (2番目、3番目) を開発した<sup>3)</sup>。特にこの2つの方法ではまったく同じ分離条件を用いて異なる検出系での分析が可能なることから、例えば2番のICPMSで新たに検出されたヒ素化合物の親イオンを3番のLC/MS/MSで探索してその構造を推定するような使い方も可能となった。一方、特にDPAA並びにPAAの高感度分析法として開発された4番の方法では、その他の手法と比較して2桁も高感度な測定が可能となった点が特長となっている<sup>4)</sup>。

マイクロLC/MS/MSの開発にあたっては、高感度であることが必須条件となる。しかしながら、4番の方法では溶媒分子をイオン化してそれを用いて対象化合物のイオンを生成するAPCIと呼ばれるイオン化法をとることから、溶液の量を減らすとイオン化効率も落ちてしまい、マイクロLCに対応できないという大きな問題を抱えていた。そこで、第1段階として、より微量な送液量にまで対応できるESIイオン化法に変えて感度の落ちない手法の探索を、通常のLC/MS/MS条件で進めた。その上で、さらに図1のマイクロLC/MS/MSでの条件検討を進め、最終的に表4の分析条件を確立した。

表4 微量試料中DPAA高感度分析のためのマイクロLC/MS/MS条件

Micro LC	Column: L-column(3 $\mu$ m) C18 0.2x150mm
	Mobile phase:
	A: Water (0.05% methyl amine)---pH7.0
	B: MeOH/Water(90/10) (0.05% methyl amine)---pH7.4
	Flow rate 1.5 $\mu$ l/min, Column temp 40 $^{\circ}$ C, Injection Volume 1 $\mu$ l
MS	Ionization: ESI, Polarity: Positive,
	CUR:20 IS:2200 TEM:150 GS1:17 DP:66 CE:37

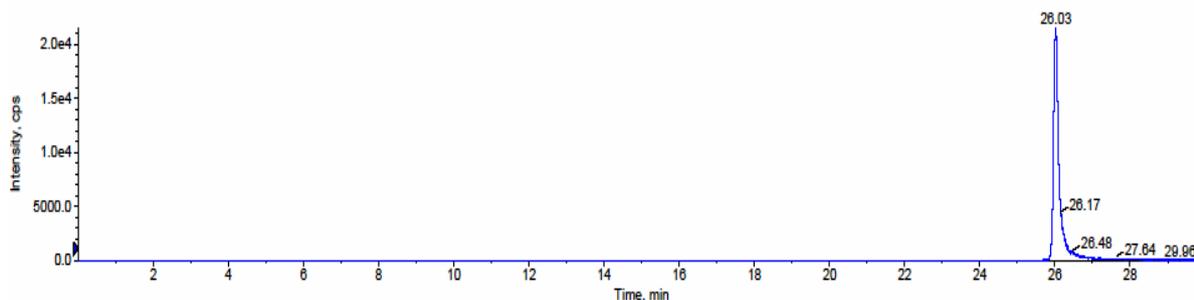


図2 DPAAの検出例  
(DPAA 1 ng As/mlを1 $\mu$ l打ち込んだ)

DPAA標準溶液のマイクロLC/MS/MSによる測定例を図2に示す。DPAAの1ngAs/ml溶液を1 $\mu$ l打ち込んだ結果、約2万カウントのDPAAのピークが検出された(打ち込んだ全量としては、ヒ素に換算して1pg、DPAAとしては約3pgに相当する)。クロマトグラムのノイズレベルからすると20カウント程度まで検出可能であり、この条件でのDPAAの検出下限は打ち込み溶液1 $\mu$ l中の濃度としては1pg As/ml、絶対量としてはヒ素として1fg、DPAAとして3fg程度となる。ちなみに、これまで最も感度の良かった表3の4番の条件では、20 $\mu$ lを打ち込んだ場合に試料溶液の検出限界が同じく1pg As/ml程度であった。従って打ち込み絶対量としては、今回の条件でさらに1/20に下がったことになる。

## 5 まとめ

分析法の相互比較や精度管理のための共通試料として作成された玄米試料中のDPAA並びに関連フェニルヒ素化合物の測定を行った。また、昨年度に引き続き、DPAA投与ラットの臓器、組織中DPAA及び類縁化合物の分析を継続した。

体内、脳内のDPAAの動態の詳細な解析のためのマイクロダイアリシス法への応用を念頭に1 $\mu$ l程度の微量な試料に対して高い感度を有するDPAA測定方法の開発を進めた。その結果、従来法で最も高感度だったODSカラムを用いたLC/MS/MS法に比較して、打ち込み試料量の絶対で比較してさらに20倍高感度な方法を作成することができた。

## 参 考 文 献

- 1) 「平成17年度ジフェニルアルシン酸等の健康影響に関する調査研究」
- 2) Y. Shibata, K. Tsuzuku<sup>1</sup>, S. Komori, C. Umedzu, H. Imai, M. Morita : Appl. Organomet. Chem., 276-281, 2005.
- 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
- 4) 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

## [2. 2] ジフェニルアルシン酸 (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 遺伝子科学部長）  
研究協力者：福田 聡（茨城県衛生研究所 技師）  
石井 崇司（茨城県衛生研究所 技師）

### 1 概要

平成 16 年度においては、地下水や海水等環境試料中の微量ジフェニルアルシン酸（以下「DPAA」という。）の簡易モニタリング法として、固相抽出法による DPAA の単離、濃縮とはん用性の高い黒鉛炉原子吸光法（以下「GF-AAS」という。）とを併用した方法を開発し報告した<sup>1)</sup>。また、DPAA の生体内における動態を解明するため、動物臓器のような生体試料を対象とした DPAA 定量法を検討した。その結果、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ための前処理法を考案し、GF-AAS に供する方法を確立することができた<sup>2)</sup>。さらに、生体及び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に、先に考案した DPAA の前処理法で DPAA を効率よく抽出し、安定同位体標識化合物（以下「<sup>13</sup>C<sub>12</sub>-DPAA」という。）を内部標準とする高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法（以下「HPLC/MS/MS」という。）に供する方法も確立した<sup>3)</sup>。

平成 17 年度には、東京大学と国立環境研究所で共同作製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 16 年度に確立した上記 HPLC/MS/MS による分析手法で測定し、今後の精度管理体制確立に向けての均質化試料の保証値決定作業に資した。

平成 18 年度は、17 年度と同様、東京大学と国立環境研究所で共同作製した有機ヒ素分析用玄米標準物質（候補）中の DPAA 濃度を HPLC/MS/MS で測定し、本標準物質（候補）の保証値決定に寄与する。また、この HPLC/MS/MS による分析手法の土壌試料への適用性についても併せて検討した。

### 2 目的

茨城県神栖市（旧神栖町）において発生した DPAA 由来の井戸水汚染、並びに農作物汚染等に関連して、今後このような問題が生じた場合に広く適用できる分析手法の開発、確立を目指して、（1）多くの試験検査機関で利用可能なはん用性の高い GF-AAS による DPAA のスクリーニング法、並びに存在量を推定できる分析手法の確立、（2）環境試料、生体試料及び農産物中の DPAA 濃度を正確に推定できる精密分析手法の確立、を主たる目的として研究を進める。

### 3 方法

#### 3. 1 試薬

DPAA 標準溶液は、和光純薬製 DPAA 標準品 10 mg 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。内部標準溶液は、林純薬製 <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-DPAA 標準品 10mg をエタノールに溶解し 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。水酸化ナトリウム溶液及び塩酸は、関東化学製の Ultrapur を使用した。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、トリフルオロ酢酸（以下「TFA」という。）は、和光純薬製の高速液体クロマトグラフ用を使用した。その他の試薬及び溶媒は市販の特級品を用いた。

### 3. 2 装置及び器具

高速液体クロマトグラフは Agilent 1100 シリーズを、質量分析装置は Applied Biosystems 製 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 TAHS-2 を使用した。HPLC/MS/MS の測定条件は表 1 に示した。

表 1 HPLC/MS/MS による DPAA の測定条件

---

HPLC 条件	
分析カラム	: Inertsil ODS-3 (2.1mm $\phi$ $\times$ 150mm、3 $\mu$ m : ジーエルサイエンス製)
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	: 0.2mL / min
カラム温度	: 25°C
注入量	: 5 $\mu$ L
MS/MS 条件	
イオン化	: ESI、ポジティブ
イオンスプレー電圧	: 4.5kV
イオンソース温度	: 450°C
定量用モニターイオン	: DPAA ; 263 $\rightarrow$ 151.9、 <sup>13</sup> C <sub>12</sub> -DPAA ; 275 $\rightarrow$ 158.0

---

### 3. 3 有機ヒ素分析用玄米標準物質（候補）中の DPAA の分析

#### 3. 3. 1 試料の前処理

玄米試料 0.2~0.3 g をネジロ遠心沈殿管に精秤し、2M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°C で 4 時間加熱分解した。

#### 3. 3. 2 検液の調製

上記試料のアルカリ分解液に、0.1  $\mu$  g/mL の内部標準溶液 0.3~1.0mL を添加し混和後、ヘキサン 8mL 及びクロロホルム 2mL を加えて 3 分間振り混ぜ 3,500rpm で 5 分間遠心分離した。有機相を分離し水相に 2M塩酸溶液 17mL を加えて溶液の塩酸濃度を約 0.5M に調整し、20%システイン溶液 2mL 及び 40%ヨウ化カリウム溶液 2mL を添加後混和し 30 分間放置した。クロロホルム 10mL を加えて 5 分間振り混ぜ DPAA を抽出し 3,500rpm で 5 分間遠心分離後クロロホルム相を分取し共栓遠心沈殿管へ綿栓ろ過した。この操作を再度繰り返してクロロホルム抽出液を合した。クロロホルム抽出液を減圧乾固し残留物をメタノール 3~10mL に溶解後孔径 0.2  $\mu$  m のメンブランフィルターでろ過し検液とした。

#### 3. 3. 3 検量線

DPAA 濃度 5~20ng /mL (ヒ素換算値 : 1.4~5.7ng/mL)、<sup>13</sup>C<sub>12</sub>-DPAA 濃度 10ng/mL の標準液を調製し、その 5  $\mu$  L を HPLC/MS/MS に供し、DPAA と <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-DPAA とのピーク面積比から検量線を作成した。

#### 3. 3. 4 定量

検液 5  $\mu$  L を表 1 に示す条件で HPLC/MS/MS に供し、検量線から試料の DPAA 濃度を算出した。

### 3. 3. 5 試料の水分含量の測定

精秤した試料約 1g を 135℃ で 1 時間加熱し、シリカゲルデシケーターで 15 分放冷後、重量を測定し、減少分を水分として計算した。

## 3. 4 土壌試料の DPAA 分析法の検討

### 3. 4. 1 試料の前処理

土壌試料 0.5g をネジ口遠心沈澱管に採り、0.1 μg/mL の DPAA 溶液 0.2mL (DPAA として 20ng、ヒ素換算値：5.7ng) を添加後、2M 水酸化ナトリウム溶液 10mL を加え超音波洗浄器で 3 分間処理し試料を分散させた。容器をアルミブロック恒温槽に移し 90℃ で 2 時間加熱した。

### 3. 4. 2 検液の調製

上記試料のアルカリ溶液に、0.1 μg/mL の内部標準溶液 0.2mL を添加し混和後、上記 3. 3. 2 と同様に操作し DPAA のクロロホルム抽出液を得た。抽出液を減圧乾固し残留物をメタノール 2mL に溶解後孔径 0.2 μm のメンブランフィルターでろ過し検液とした。

### 3. 4. 3 検量線

3. 3. 3 と同様な操作を行い検量線を作成した。

### 3. 4. 4 定量

3. 3. 4 と同様な操作を行い DPAA 濃度を算出した。

## 4 結果及び考察

### 4. 1 有機ヒ素分析用玄米標準物質（候補）中の DPAA 濃度

表 2 に低濃度用試料 (L110) 及び高濃度用試料 (H276) の測定結果を示す。乾燥重量あたりに換算した L110 及び H276 の DPAA 濃度はそれぞれ 217.3ng/g (ヒ素換算値：62.1ngAs/g) 及び 503.3ng/g (ヒ素換算値：143.8 ngAs/g) であり、測定値の相対標準偏差は約 3% と良好な再現性が得られた。なお、試料の水分含量は、L110 で 11.7%、H276 では 11.3% であった。

表 2-1 玄米標準物質の DPAA 濃度測定結果

試料	測定値 (ngDPAA/g dry)	平均値 (ngDPAA/g dry)	C.V. (%)
L110	213.3, 223.3, 217.0, 222.9, 210.1	217.3	2.7
H276	504.9, 507.2, 480.4, 498.7, 525.3	503.3	3.2

表 2-2 玄米標準物質の DPAA 濃度測定結果

試料	測定値 (ngAs/g dry)	平均値 (ngAs/g dry)	C.V. (%)
L110	60.9, 63.8, 62.0, 63.7, 60.0	62.1	2.7
H276	144.3, 144.9, 137.3, 142.5, 150.1	143.8	3.2

#### 4. 2 土壌試料中の DPAA 分析法の検討

平成 16 年度に確立した HPLC/MS/MS による動植物中 DPAA 分析手法の土壌試料への適用性について検討した。畑土壌及び水田土壌を用いて DPAA の添加回収試験を行った結果を表 3 に示したが、その回収率はそれぞれ 98.0% 及び 100.0%、測定値の相対標準偏差は 7.0% 及び 5.2% とほぼ満足すべき結果が得られた。また、本法による定量下限値は、HPLC/MS/MS による検出限界を 2ng/ml、試料採取量を 0.5g とした場合 8ng/g (ヒ素換算値：2.3 ng/g) となる。そのため、本法は土壌試料中の DPAA 分析法として十分実用に供し得るものと考えられた。

表 3 土壌試料の添加回収試験結果

試料 (g)	添加量 (ng)	測定値 (ng)	平均値 (ng)	回収率 (%)	C.V. (%)
畑土壌 (0.5)	0	0	0	98.0	7.0
	20	19.4, 21.6, 18.6, 20.4, 18.2	19.6		
水田土壌 (0.5)	0	0	0	100.0	5.2
	20	19.9, 21.4, 18.7, 19.5, 20.7	20.0		

#### 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 (DPAA) 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 年度並びに平成 17 年度までにジフェニルアルシン酸 (DPAA) の合成、HPLC/ICP-MS を用いた地下水並びに土壌、イネ、米中の DPAA の検出法を確立した。また生体試料中の DPAA 検出法についても検討し、感度、精度ともにより良い分析法を確立した。平成 18 年度はこれらの分析法をさらに発展させ、DPAA 及びフェニルアルソン酸 (PAA) に加えて環境試料並びに生体試料から検出されたメチル化代謝物の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)、フェニルメチルアルシン酸 (PMAA) が同時に分離検出できる分析法を確立した。またこれらの関連ヒ素化合物について地下水、土壌、イネ、米、実験動物尿からの同時一斉分析を行うための試料の前処理法について検討した。

### 2 目的

地下水や土壌中など環境中における DPAA 並びにメチル化フェニルヒ素化合物の挙動、またイネにおける取込み、代謝、さらに実験動物やヒトにおける代謝、排泄について明らかにするため DPAA、PAA、PMAA、PDMAO、DPMAO などのジフェニルアルシン酸関連物質の感度並びに精度ともに優れた分析法を確立することを目的とした。また分析試料の前処理法並びにフェニルヒ素化合物の検討も併せて行った。

### 3 方法

#### 3. 1 標準ヒ素化合物

DPAA、PDMAO、DPMAO、PMAA はトリケミカル研究所より譲与された。PAA はアクロス社より購入した。

#### 3. 2 試料

##### 3. 2. 1 環境試料

水田土壌、イネ葉並びに玄米は茨城県神栖市（旧神栖町）B 地区から 2005 年 9 月に採取した。試料は地下水取水口からそれぞれ 3、7、25 m の地点を採取地点とした。

##### 3. 2. 2 マウス尿試料

マウスにフェニルヒ素化合物 (DPAA、PAA 及び PMAA) をそれぞれ添加した試料を 1 ヶ月間

摂取させ、1 ヶ月後尿を回収し測定を行った。フェニルヒ素化合物添加試料は粉碎したカロリーメイト 100 g に各フェニルヒ素化合物を 2  $\mu\text{gAs/g}$  となるように添加し、凍結乾燥後、同量の小麦粉と併せ攪拌して摂取させた。

### 3. 2. 3 イネを用いた水耕栽培並びに土壌栽培試料

PAA、PMAA、PDMAO、DPAA、DPMAO をそれぞれ添加した栽培液 (1mgAs/L、100mL)、土壌 (1mgAs/kg、45g) を用いて、イネの水耕栽培、土壌栽培を行った。水耕栽培では根腐れを防ぐため、エアレーションを行い、27°C、12 時間蛍光灯 (2250lx) 照射、12 時間非照射の条件で栽培した。栽培中は水量を 100mL に保つため、適宜水を加え、栽培直後、1 週目、2 週目の水を採取し、フィルターろ過を行った後、HPLC/ICP-MS を用いて測定した。イネ葉、イネ根は 2 週間栽培後に採取してフェニルヒ素化合物の抽出を行った。土壌栽培は表面から 1cm の深さに播種し、27°C、12 時間蛍光灯 (2250lx) 照射、12 時間非照射の条件で栽培した。栽培中は適宜水を与えた。播種直後及び 2 週目の土を採取した。イネ葉、イネ根は 2 週間栽培後に採取してフェニルヒ素化合物の抽出を行った。

### 3. 3 固相カートリッジのコンディショニング

測定試料の固相抽出並びに濃縮を行うため、あらかじめ Aquasis PLS-3 はメタノール 5 mL、50% メタノール 5mL、水 10 mL (硝酸で pH 1.0 に調製) でコンディショニングを行い、試料溶液を 1.0mL/min の割合で通液した。固相は水 3 mL を用いて洗浄した後、乾燥させた。

### 3. 4 測定試料の調製

#### 3. 4. 1 地下水

地下水は 0.45  $\mu\text{m}$  フィルターを用いる過したものを測定試料とした。

#### 3. 4. 2 土壌

0.2g を量り取り、1M 水酸化ナトリウム水溶液 5mL に懸濁させ、80°C で 60 分間加熱してフェニルヒ素化合物を抽出した。この懸濁液を 1 分間、5,000 rpm で遠心分離し上清を得た。残渣はこの抽出操作を 2 度繰り返した。得られた上清を合わせ 3N 硝酸 7.5mL を加えて酸性とし、生じた沈澱を除去するため 1 分間、5,000 rpm で遠心分離を行った。得られた上清は固相抽出を行い、フェニルヒ素化合物はメタノール 10mL を用いて溶出した。溶出液はエバポレーターを用いて乾固し、超純水 0.5 mL に再溶解してフィルターろ過を行った後、その 5  $\mu\text{L}$  を HPLC/ICP-MS に導入した。

#### 3. 4. 3 米、イネ葉、イネ根

それぞれ 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。懸濁液を水浴を用いて 80°C 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 1 分間、5,000 rpm で遠心分離し上清を得た。残渣はこの抽出操作を 2 度繰り返した。得られた上清を合わせた後、溶媒を減圧留去し、水 5 mL (硝酸で pH 1.0 に調製) に再溶解させた。得られた抽出液は固相抽出を行い、フェニルヒ素化合物はメタノール 10 mL を用いて溶出した。溶出液はエバポレーターを用いて乾固し、超純水 0.5mL に再溶解してフィルターろ過を行った後、その 5 $\mu\text{L}$  を HPLC/ICP-MS に導入した。

### 3. 5 HPLC/ICP-MS による DPAA 並びにメチルヒ素化物分離法の検討

分析用カラムとして CHEMCOSORB 5CN-U (2.1 $\times$ 150 mm) を検討し、これまで分析用に用いた Inertsil CN-3 (1.5 $\times$ 150mm) カラムと比較して分離の改善を図った。また Inertsil C4 (2.1 $\times$ 150mm) カラムを利用し、疎水性を持つ支持体による分離を試みた。なお、ガードカラムには両方法ともに Inertsil C4 (1.0 $\times$ 10 mm) を使用した。HPLC/ICP-MS 測定条件を表 1 に示した。

表 1 HPLC/ICP-MS 分析条件

	[HPLC-1]	[HPLC-2]	[ICP-MS]
カラム	CHEMCOSORB 5CN-U (2.1×150 mm)	Inertsil C4 (2.1×150 mm)	Neb gas 0.9 l/h
移動相	リン酸緩衝液 (pH5.5) / CH <sub>3</sub> OH/CH <sub>3</sub> CN = 70/20/10	水 (pH1.5 by 硝酸) / C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH/CH <sub>3</sub> CN = 80/15/5	Aux gas 1.15 l/h Plasma gas 18 l/h
流速	0.2 ml/min	0.3 ml/min	RF power 1600 W
温度	40°C	40°C	Cell gas 0.8 ml/min
注入量	10 µl	20 µl	m/z 91

#### 4 結果及び考察

##### 4. 1 固相抽出条件の検討

Aquisis PLS-3 を用いて抽出並びに濃縮を検討したところ、PAA、PMAA、PDMAO、DPAA、DPMAO はそれぞれ担体に保持され、メタノールにより溶出され、96.8%以上と良好な回収率を得た。それらの回収率を表 2 に示した。また自然界に存在している無機ヒ素化合物及びメチルヒ素化合物は固相充填剤に保持されず、フェニルヒ素化合物部との分離が可能であった。

##### 4. 2 HPLC/ICP-MS による分離カラムの検討

分析用カラムとして CHEMCOSORB 5CN-U を検討したところ、PAA、PMAA、PDMAO、DPAA、DPMAO それぞれの分離が改善され、図 1 に示すように良好なクロマトグラムが得られた。フェニルヒ素化合物同士の分離は行われてはいたが、自然界由来の無機ヒ素や海産物由来のメチルヒ素と PAA の保持時間が重なる成分が存在したことから、今後、自然界由来のヒ素種と PAA が共存する場合においては固相抽出等の前処理の検討がさらに必要であると思われる。

Inertsil C4 カラムを用いた分析条件では図 2 に示すように、良好な分離が確認され、比較的シャープなピークが得られたことにより、高感度で多成分分析が可能であると推定された。

以上の二種の分析用カラムを用いることでフェニルヒ素化合物のより精度の高い定性が行われると考えられた。また、本法で保持されない極性ヒ素化合物については既存のイオンペア試薬添加やイオン交換カラムによる分析法を利用することで補うことができると考えられた。

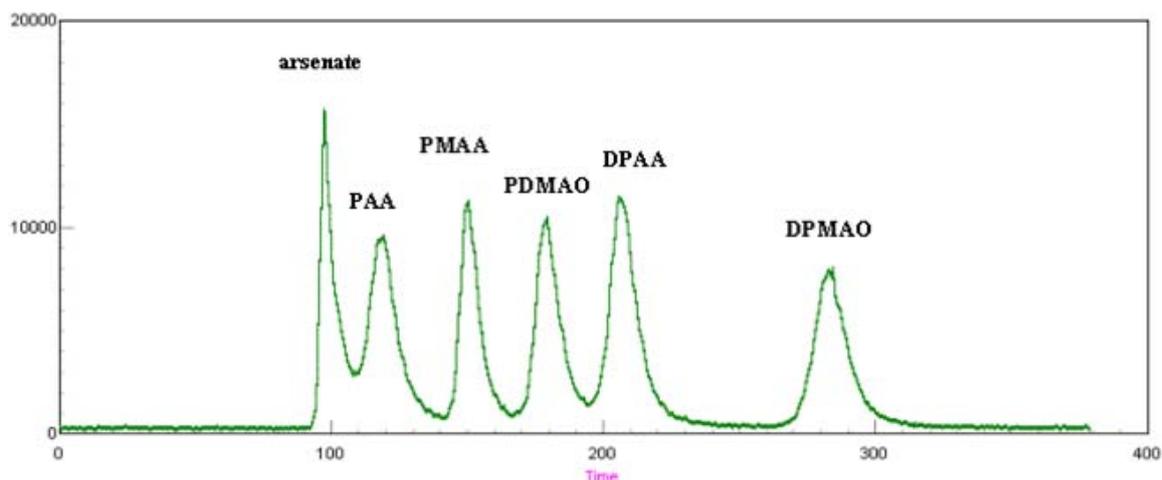


図 1 5CN-U カラムを利用したクロマトグラム

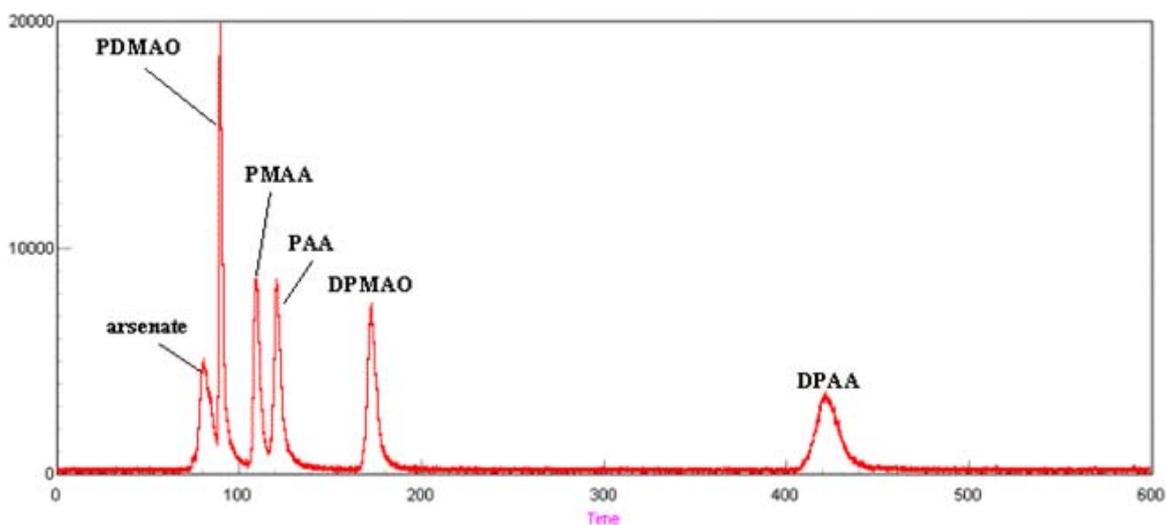


図2 C4カラムを利用したクロマトグラム

#### 4. 3 環境試料からの DPAA 並びにメチル化物の検出

汚染地下水からはこれまで報告されたとおり PAA や DPAA が主成分として検出され、またその他に多くの未知のヒ素化合物が検出された。図3にそのクロマトグラムを示した。また汚染土壌から採取された米を分析したところ、図4に示すように PMAA が主成分として検出され、極めて低濃度の PDMAO、DPMAO、DPAA が検出された。さらにクロマトグラム上の 300~350sec に見られる未知ピークが複数の汚染米試料において検出された。

またマウス尿では、ほとんどフェニルヒ素はマウス体内で代謝されていなかったが、わずかにメチル化合物やそれ以外のピークが検出された。図5に PMAA 摂取マウスの尿クロマトグラムを示した。

以上の結果より、本分析法が環境試料及び生体試料の高感度検出法として非常に適していることが明らかとなった。

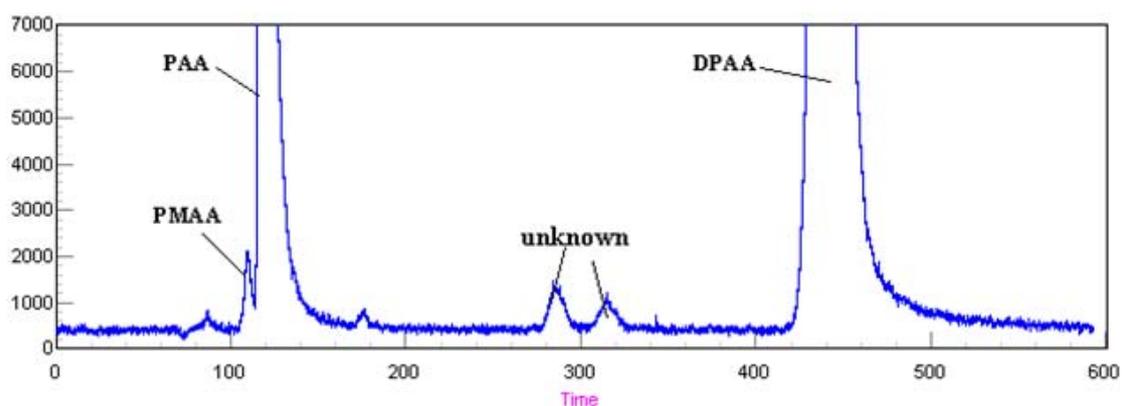


図3 汚染地下水クロマトグラム (C4カラム)

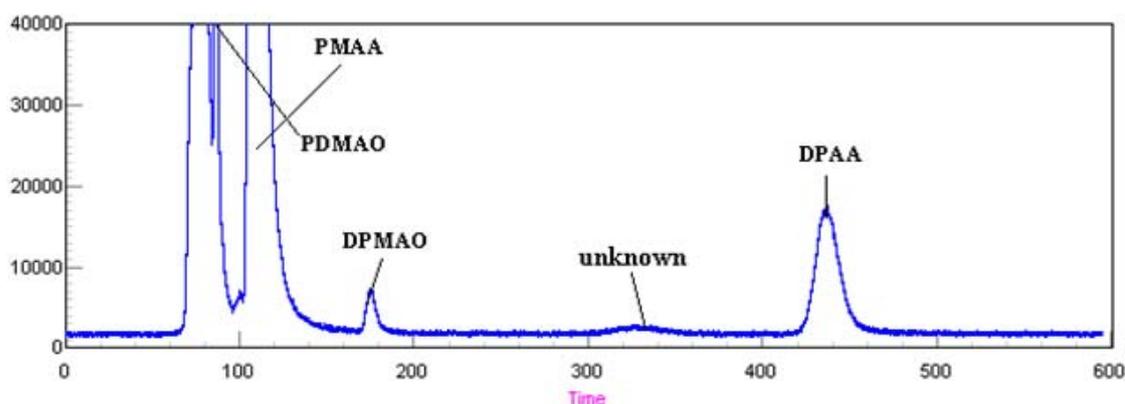


図4 汚染米試料クロマトグラム (C4 カラム)

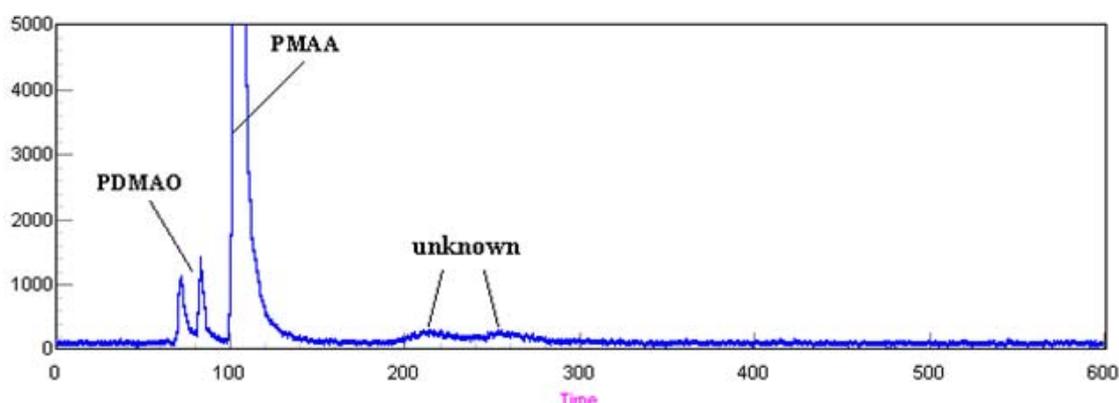


図5 PMAA を投与したマウス尿クロマトグラム (C4 カラム)

#### 4. 4 環境試料中フェニルヒ素化合物抽出法の検討

土壌、米、イネ葉、イネ根にそれぞれのフェニルヒ素化合物を添加して Aquasis PLS-3 を用いた添加回収試験を行った結果を表2に示した。土壌では5種のフェニルヒ素化合物が84.0%以上の回収率で同時抽出可能であった。また米、イネ葉、イネ根中の添加回収率も表2に示した。米中のPAAは回収率が79.9%であり、PMAA、DPAA、PDMAO、DPMAOは87.6%以上の回収率で同時抽出可能であった。イネ葉では88.1%以上の回収率で、またイネ根中フェニルヒ素化合物は90.6%以上の回収率であった。

表2 フェニルヒ素化合物の回収率

	Recovery (%) (n=4)					CV (%) (n=4)				
	PAA	PMAA	PDMAO	DPAA	DPMAO	PAA	PMAA	PDMAO	DPAA	DPMAO
固相抽出	96.8	101.5	102.2	103.4	110.1	2.2	1.8	2.2	3.0	4.2
土壌	98.6	101.0	109.7	92.6	84.0	7.4	6.7	3.1	12.8	7.9
米	79.9	107.8	87.6	98.2	101.9	12.7	3.6	7.0	3.2	4.1
イネ葉	88.1	97.4	99.6	95.1	92.5	12.5	2.7	2.3	3.1	3.0
イネ根	90.6	97.3	103.7	95.8	93.6	8.6	4.3	6.4	5.4	1.1

#### 4. 5 神栖 B 地区環境試料の測定

神栖 B 地区から採取した水田土壌、イネ葉、玄米の HPLC/ICP-MS クロマトグラムを図 6 に、またフェニルヒ素化合物の濃度を表 3 に示した。水田土壌中からは PAA、PMAA、PDMAO、DPAA、DPMAO が検出された。水田土壌中のフェニルヒ素化合物汚染は灌漑水の取水口からの距離に近い地点ほど濃度が高い傾向にあり、汚染が灌漑用地下水中のフェニルヒ素化合物に由来する可能性が強く示唆された。さらに地下水中からは PAA 及び DPAA が主に検出されたが、土壌中では PMAA、PDMAO、DPMAO が検出された。この結果より土壌微生物によって PAA、DPAA が PMAA、PDMAO、DPMAO などの化合物にメチル化されている可能性が示唆された。

モデル水田から収穫されたイネ葉中からは PMAA、PDMAO、DPMAO が検出され、そのうち PDMAO は土壌中 PDMAO 濃度の約 3 倍、DPMAO は土壌中 DPMAO 濃度の約 2 倍に濃縮されていたことから、イネによる各フェニルヒ素化合物の取込み及び蓄積に差があること、土壌中の PAA、DPAA がイネによって PDMAO、DPMAO にメチル化されている可能性が示唆された。また玄米中では PMAA のみが高濃度に蓄積を示したことから、イネにおけるフェニルヒ素化合物の蓄積部位が各化合物によって異なることが示された。

精白処理による玄米中 PMAA 濃度の減衰を図 7 に示した。玄米精白処理過程での PMAA 濃度の変化を調べた結果、精白処理により PMAA 濃度は 42.4~61.6%に減少した。しかしその糠からは玄米の 2 倍以上の濃度の PMAA が検出され、PMAA はイネの糠に蓄積される傾向があり、それぞれの部位によって蓄積が異なる可能性が示唆された。

表 3 神栖 B 地区汚染水田試料中のフェニルヒ素化合物濃度

取水口からの距離	試料 (n=3)	PAA	PMAA	PDMAO (ugAs/kg)	DPAA	DPMAO
3 m	土壌	42.6 ± 6.6	420.8 ± 38.3	205.1 ± 8.6	82.5 ± 7.4	137.0 ± 2.6
	イネ葉	N.D.	362.4 ± 57.4	692.3 ± 39.7	N.D.	256.0 ± 22.3
	玄米	N.D.	1031.3 ± 109.7	N.D.	N.D.	N.D.
7 m	土壌	29.9 ± 0.7	295.6 ± 19.1	171.7 ± 5.1	52.7 ± 7.4	72.4 ± 8.1
	イネ葉	N.D.	183.2 ± 33.0	271.4 ± 18.3	N.D.	138.6 ± 6.7
	玄米	N.D.	1008.1 ± 56.3	N.D.	N.D.	N.D.
25 m	土壌	36.5 ± 1.3	334.8 ± 38.0	163.1 ± 0.9	61.5 ± 7.7	83.6 ± 7.5
	イネ葉	N.D.	288.2 ± 54.5	590.8 ± 7.5	N.D.	173.2 ± 13.3
	玄米	N.D.	719.0 ± 32.5	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. : not detected

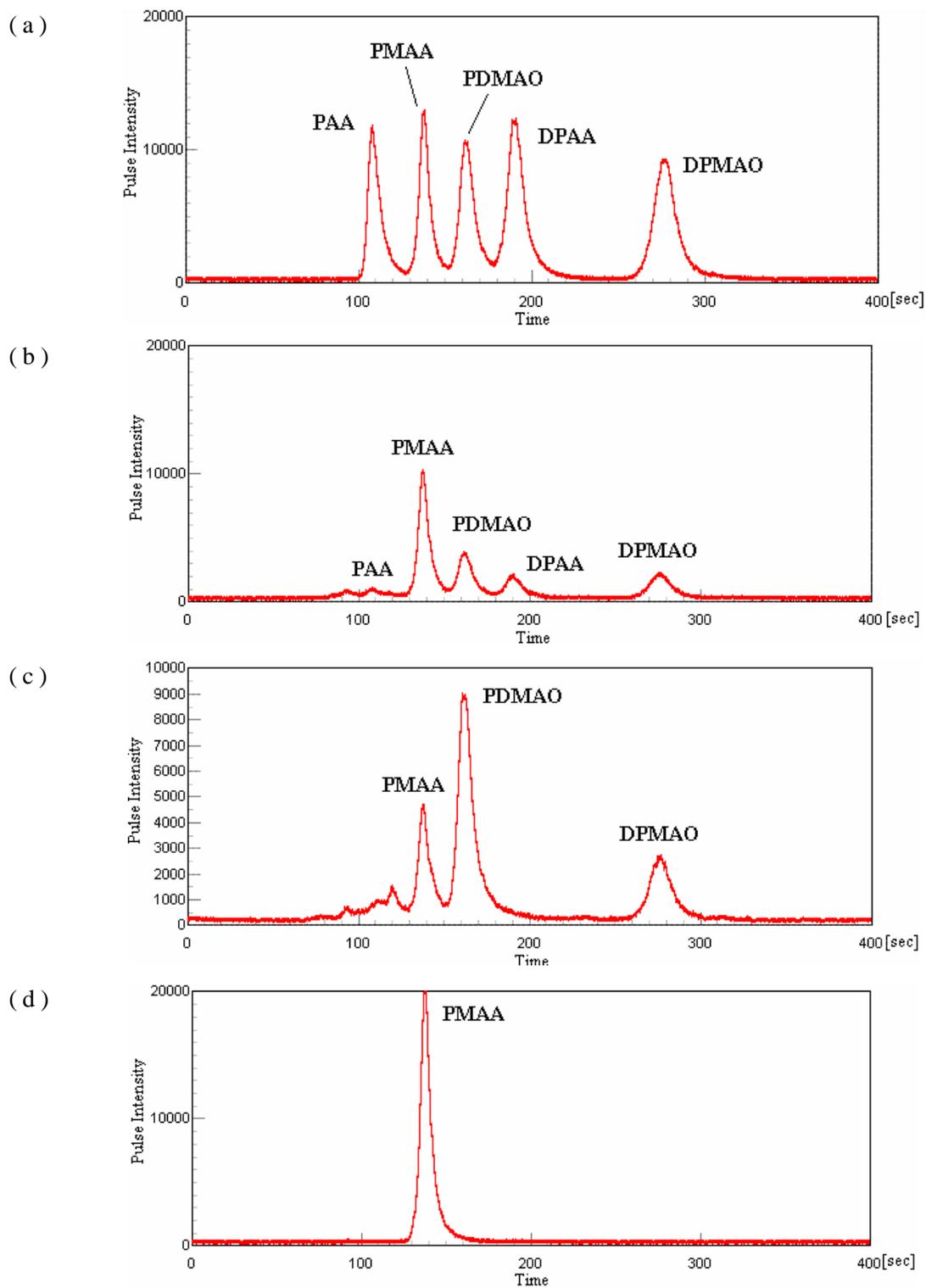


図6 モデル水田土壌、イネ葉、収穫米（2005年9月採取、25 m 地点）の HPLC/ICP-MS クロマトグラム

((a)標準品 100  $\mu\text{gAs/L}$ 、(b)モデル水田土壌、(c)イネ葉、(d)収穫米)

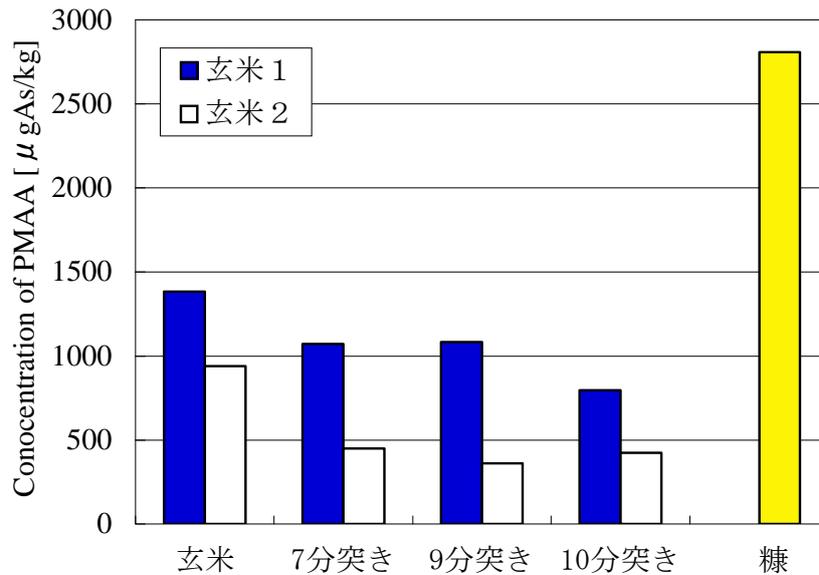


図7 精白処理による玄米中 PMAA 濃度の減衰

#### 4. 6 イネによるフェニルヒ素化合物の取込み

PAA、PMAA、PDMAO、DPAA、DPMAO をそれぞれ添加した栽培液及び土壌を用いてイネを栽培した結果、PAA、PMAA、PDMAO、DPAA、DPMAO はイネにおいて代謝されないことが明らかになった。また実験中に土壌、栽培液中フェニルヒ素化合物の変化並びにイネの成長阻害は観察されなかった。水耕栽培イネ及び土壌栽培イネにおけるフェニルヒ素化合物の吸収率を図8、9にそれぞれ示した。水耕栽培、土壌栽培ともに PAA、PDMAO、DPAA は根に蓄積されやすく、PMAA、DPMAO は葉に蓄積されやすい傾向が示され、イネにおける蓄積部位は各フェニルヒ素化合物によって大きく異なることが明らかとなった。さらに水耕栽培においてイネへの吸収率は PAA、PDMAO、DPMAO、PMAA、DPAA の順に高く、土壌栽培においては PDMAO、DPMAO、PMAA、PAA、DPAA の順に吸収率が高いことが示され、イネにおける吸収率は各フェニルヒ素化合物によって大きく異なることが明らかとなった。

この結果から神栖地区から採取したイネ葉中に PAA、DPAA が検出されなかった理由は、土壌栽培において PAA、DPAA の葉への吸収率が PMAA、PDMAO、DPMAO と比較して極めて低いためであることが示された。また土壌栽培においてフェニルヒ素化合物のイネによる吸収率が水栽培と比較して極めて低い原因として、各フェニルヒ素化合物の水への溶解度の差及び土壌への吸着力の違いが考えられた。

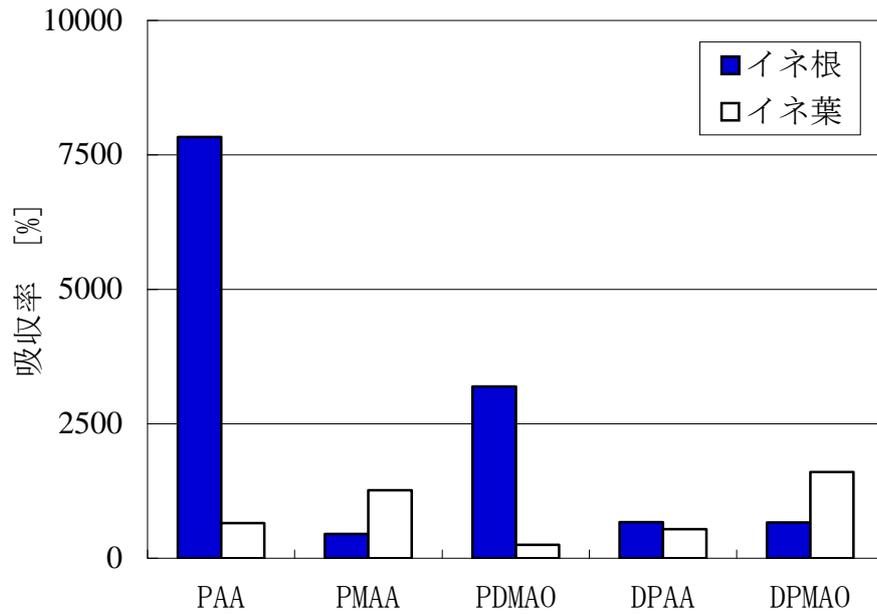


図8 各フェニルヒ素化合物添加群の水耕栽培イネにおける栽培液中フェニルヒ素化合物の吸収率

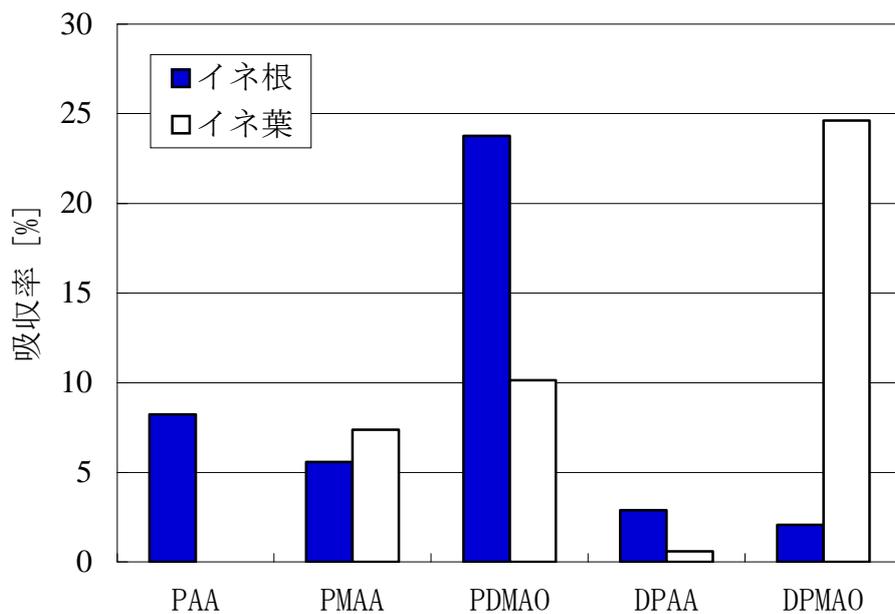


図9 各フェニルヒ素化合物添加群の土壌栽培イネにおける土壌中フェニルヒ素化合物の吸収率

## 5 まとめ

本法を用いることにより、環境試料及び生体試料中フェニルヒ素化合物を高感度に測定することが可能であった。また環境試料の前処理法を確立し、神栖汚染地区における環境試料に応用した結果、分析精度、迅速性ともに良好な手法であることが明らかとなった。水田土壌におけるフェニルヒ素化合物の代謝、イネにおける取込みや蓄積の差が見られた。またイネにおける各フェニルヒ素化合物の吸収、蓄積部位の違いが観察された。

## 参 考 文 献

### 【発表文献】

- 1) Kinoshita, K., Honda, K., Seto, Y., Kaise, T., Determination of degradation compounds derived from lewisite by high performance liquid chromatography/ inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Appl. Organomet. Chem.*, **20**, 591-596, 2006.
- 2) Kinoshita, K., Ochi, T., Suzuki, T., Kita, K., Kaise, T., Glutathione plays a role in regulating the formation of toxic reactive intermediates from diphenylarsinic acid, *Toxicol.*, **225**, 142-149, 2006.
- 3) Ochi, T., Kinoshita, K., Suzuki, T., Miyazaki, K., Noguchi, A., Kaise, T., The role of glutathione on the cytotoxic effects and cellular uptake of diphenylarsinic acid, a degradation product of chemical warfare agents, *Arch. Toxicol.*, **80**, 486-491, 2006.
- 4) 木下健司、貝瀬利一、遺棄化学兵器関連化合物による環境汚染と測定技術の動向、産業と環境, **8**, 31-34, 2006.

### 【学会発表】

- 1) Kinoshita, K., Ochi, T., Kaise, T., Dynamic Behavior of Diphenylarsinic Acid and Related Phenylarsenic Compounds in Culture Medium, ICEBAMO, Crete Greek, 2006.
- 2) Ochi, T., Suzuki, T., Kinoshita, K., Niguchi, A., Kaise, T., The role of glutathione on the cytotoxic effects and cellular uptake of diphenylarsinic acid, ICEBAMO, Crete Greek, 2006.
- 3) Noguchi, A., Kinoshita, K., Hiyama, T., Nirei, H., Kaise, T., Determination of Phenylarsenic compounds in Environmental sample, International symposium on health hazard by arsenic contamination of groundwater and its countermeasures, Miyazaki, 2006.
- 4) 野口綾乃, 木下健司, 檜山知代, 楡井久, 貝瀬利一: 神栖市における米のフェニルヒ素汚染, プラズマ分光分析研究会 '06 つくばセミナー, 2006
- 5) 野口綾乃, 木下健司, 檜山知代, 楡井久, 貝瀬利一: 神栖における米のフェニルヒ素化合物汚染, 第15回日本環境化学討論会, 2006

## [ 2. 4 ] 環境試料中ジフェニルアルシン酸 (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

2003年3月の茨城県神栖市（旧神栖町）でのジフェニルアルシン酸 (DPAA) による健康影響によって、DPAAの毒性、環境動態、さらには地域住民のばく露評価、疫学などの調査研究がスタートした。さらにはDPAAの分解代謝産物と考えられる各種有機ヒ素化合物（モノフェニルアルイシン酸 (MPAA)、フェニルメチルアルシン酸 (PMAA) など）も環境中から検出されるようになった。こうした状況の中で、DPAAをはじめとする各種有機ヒ素化合物分析はあらゆる調査研究の最も基礎をなすものであるが、そうした分析の結果として得られる分析値は信頼性の高いものであることが必要である。

分析の信頼性確保にはいくつかの方法があるが、もっとも効率的・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・食品分析を念頭に置き、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精度管理用試料を作製することを目的とした。

### 3 方法

#### 3. 1 作製方法

茨城県神栖地域で栽培され、有機ヒ素類の汚染が確認された玄米を原材料とした。予備分析により、DPAA、PMAA 等有機ヒ素濃度の低いもの、高いものを、それぞれ 1 種類ずつ計 2 種類選定して原材料とした。

原材料とした玄米のうち高濃度レベルのものは、約 10kg をロータースピードミル (P-14、フリッチ) により粉砕した。粉砕後の粉末のうち、150 $\mu$ m のプラスチック製ふるいを通過した約 7kg を V 型混合機で 2 時間混合した。混合後、約 20g ずつ 300 本の褐色瓶に分注した。同じ作業を低濃度レベルの玄米についても行い、高濃度、低濃度ともそれぞれ 300 本、計 600 本の玄米粉末を作製した (図 1)。試料の作製は国立環境研究所において行った。なお以上の玄米粉末作製条件は平成 17 年度の研究成果に基づくものである。作製した玄米粉末はすべて国立環境研究所内の冷凍庫に保管されている。微生物による有機ヒ素類の分解・変質を避けるためである。

## 4 結果並びに考察

### 4. 1 均一性評価

2つの濃度レベルの玄米粉末について、作製した300本の瓶からそれぞれ5本を無作為に抽出し、各瓶から250 mg ずつ4サブサンプルをとって、テフロンビーカーと硝酸・過塩素酸・フッ化水素酸による開放分解を行った(4サブサンプル×5瓶=20サンプル)。分解液中のAl、Ca、Cu、Fe、K、Mg、Mn、Na、P、S、Zn濃度をICP発光法により測定し、その結果を一元配置分散分析によって解析した。その結果、これら元素濃度の瓶間変動は有意ではなく、作製した300本はどれをとっても均一な試料であるとみなすことができた(表1)。これは高濃度、低濃度ともあてはまる。なお、Al、Fe以外の元素については、瓶内変動もICPの測定精度の範囲内にあり、十分小さかったため、瓶内においても均一であると考えられる。



図1 作製した玄米粉末試料

表1 作製した玄米粉末の均一性試験結果

	単位	低レベル			高レベル		
		平均±SD	瓶内 CV %	瓶間 CV %	平均±SD	瓶内 CV %	瓶間 CV %
Al	mg/kg	13.9	10.7	10.5	12.3	9.6	7.3
Ca	mg/kg	99.5	1.5	1.5	201	0.6	0.8
Cu	mg/kg	3.5	4.7	4.6	3.8	5.0	4.6
Fe	mg/kg	15.1	27.4	13.7	20.5	2.9	2.3
K	%	0.266	0.7	0.6	0.393	0.6	0.5
Mg	%	0.145	0.7	0.8	0.179	0.7	0.5
Mn	mg/kg	25.6	0.7	1.0	46.8	0.6	0.3
Na	mg/kg	15.2	7.4	5.8	41.0	3.3	3.0
P	%	0.328	0.6	0.5	0.416	0.8	0.5
S	mg/kg	908	1.3	1.4	953	1.0	0.4
Zn	mg/kg	19.7	1.1	1.5	28.3	0.6	0.8

#### 4. 2 共同分析

有機ヒ素分析あるいは食品分析の経験が豊富な国内8機関に作製した玄米粉末試料（高濃度、低濃度それぞれ1瓶）を送付し、共同分析を依頼した。分析法は各機関で日常的に使用しているものとし、特に指定をしなかった。分析対象成分は、①DPAA、PMAA等有機ヒ素、②総ヒ素、③ヒ素以外の微量金属とした。

約2ヶ月の共同分析期間の後、平成19年3月時点で7機関から分析結果の報告があった。表2（高濃度）、表3（低濃度）にその結果を示した。有機ヒ素、総ヒ素濃度はすべて乾燥重量あたりのmg As/kgに統一して表記してある。

表2 玄米粉末（高濃度）共同分析結果

	Lab A	Lab B	Lab C	Lab D	Lab E	Lab F	Lab G
前処理	アルカリ分解-クロホルム抽出	熱水抽出-限外濾過-精製	水/メタノール抽出-固相抽出		アルカリ分解-アミラーゼ処理-溶媒抽出	アルカリ分解-エーテル抽出	アルカリ分解-アミラーゼ処理-溶媒抽出
分析法*	LC/MS/MS	LC/MS/MS (ICPMS)	LC/ICPMS (ICPMS)	(ICPMS)	LC/MS/MS	LC/MS/MS (HGAAS)	LC/ICPMS
定量法	同位体希釈	同位体希釈	検量線法		同位体希釈	同位体希釈	回収率補正
水分含量%	11.3	13.4	10.7	11.1	8.58	10.8	10.5
DPAA**	0.144	0.094	0.080		0.155	0.12	0.14#
MPAA**		0.0060	0.0247		0.0148		0.013
PMAA**		1.2	1.718		1.60	2.06	1.70
t-As**		2.5	2.894	2.40		1.41	-

\* 有機ヒ素化合物の分析法。総ヒ素の分析法はカッコ内。

\*\*単位：mg As/kg dry wt.

# LC/MS/MS でサロゲート添加・回収率補正の結果も同じであった。

表3 玄米粉末（低濃度）共同分析結果

	Lab A	Lab B	Lab C	Lab D	Lab E	Lab F	Lab G
前処理	アルカリ分解-クロロホルム抽出	熱水抽出-限外濾過-精製	水/メタノール抽出-固相抽出		アルカリ分解-アミラーゼ処理-溶媒抽出	アルカリ分解-エーテル抽出	アルカリ分解-アミラーゼ処理-溶媒抽出
分析法*	LC/MS/MS	LC/MS/MS (ICPMS)	LC/ICPMS (ICPMS)	(ICPMS)	LC/MS/MS	LC/MS/MS (HGAAS)	LC/ICPMS
定量法	同位体希釈	同位体希釈	検量線法		同位体希釈	同位体希釈	回収率補正
水分含量%	11.7	12.6	11.5	10.5	9.02	11.5	11.4
DPAA**	0.062	0.035	0.0285		0.0695	0.061	0.064#
MPAA**		0.0037			0.0098		0.0092
PMAA**		0.12	0.184		0.205	0.40	0.20
t-As**		0.52	0.570	0.551		0.32	-

\* 有機ヒ素化合物の分析法。総ヒ素の分析法はカッコ内。

\*\*単位：mg As/kg dry wt.

# LC/MS/MS でサロゲート添加、回収率補正の結果は0.068であった。

現時点での報告値をまとめて暫定的に集計した結果が表4である。

表4 玄米粉末中有機ヒ素及び総ヒ素濃度の暫定的な集計値 (mg As/kg dry wt.)

	高濃度試料	低濃度試料
DPAA	0.12±0.03	0.053±0.016
MPAA	0.015±0.007	0.008±0.003
PMAA	1.7±0.28	0.22±0.09
t-As	2.3±0.6	0.49±0.10

各成分について、報告値の標準偏差を算術平均で除した変動係数を算出すると、高濃度試料で16～47%、低濃度試料で20～41%と、報告値の幅がかなり広いことがわかる。有機ヒ素分析を行った7機関中4機関が本来ならば精確さに優れた同位体希釈法を採用していることを考慮すると、この不一致の原因として玄米粉末試料からの有機ヒ素化合物の抽出効率の違いが考えられる。たとえばDPAAは、アルカリ分解を前処理とした4機関の値が、アルカリ分解していない2機関の値よりも明らかに高い。しかしこの傾向はPMAAでは明らかではない。各機関が採用した前処理法ごとに、その有機ヒ素抽出効率について検証していく必要があることが判明した。検証にあたっては、試料への添加回収実験では不十分であり、今回の結果をもとに、アルカリ分解を組み入れた前処理法を当面の基準前処理法として評価していく必要があると考えられる。

総ヒ素は4機関から報告があったが、水素化物発生原子吸光法（HGAAS）を採用した1機関のみがやや低値を示した他は機関間の一致はかなり良い。HGAASは試料中のすべてのヒ素化合物が完全に無機ヒ素の状態であることを要求する分析法である一方、DPAA類は無機ヒ素まで完全に酸化分解することが困難であることが知られている。他3機関が使用したICPMSは試料中のヒ素化合物の形態によらずに定量できる方法なので、分解法が測定値に影響しなかったものと考えられる。総ヒ素においても、測定法によっては前処理法に注意を払う必要があることが判明した。

今後、これらの考察を元に、共同分析機関には再実験を依頼し、集計値の信頼性を増して行く必要がある。またその過程で各機関における有機ヒ素分析上の問題点などの知見が集積されることが望まれる。

