

15年度 厚生労働科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）分担研究報告書

食品中の有害物質等の評価に関する研究

主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所 松田 りえ子

分担研究者 大阪府立公衆衛生研究所 堀 伸二郎

協力研究者 大阪府立公衆衛生研究所 桑原 克義, 阿久津 和彦

新潟県保健環境科学研究所 酒井 洋

PCB 及び水銀試験法の開発に関する研究

要 旨

1. PCB

(略)

2. 水銀

- 1) 従来法を用いて総水銀及びメチル水銀の測定を行った。
- 2) メチル水銀については、従来法のパックドカラム ECD/GC 法よりより精密なキャピラリーカラム GC/MS 法を開発した。従来法との比較検討の結果、両分析法の間に高い相関が認められた。
- 3) メチル水銀分析における直接抽出法とアルカリ分解-ジチゾン抽出法を比較検討した。その結果、両分析法の間で差異は認められなかった（相関係数）。
- 4) メチル水銀の実態調査は、日本で食されている 6 種類（銀ダラ、アラスカメヌケ、本メヌケ、キンメダイ、トチザメ、シロザメ（4 試料））の魚類について総水銀及びメチル水銀を測定した。

各魚類のメチル水銀濃度の平均値は、銀ダラ（7 試料）0.18 mg/kg (0.03~0.37)、アラスカメヌケ（3 試料）0.21 mg/kg (0.08~0.31)、本メヌケ（7 試料）0.27 mg/kg (0.17~0.45)、キンメダイ（10 試料）0.48 mg/kg (0.27~0.83)、トチザメ（3 試料）0.41 mg/kg (0.30~0.61)、シロザメ（4 試料）0.05 mg/kg (0.04~0.08)であった。

I. PCB 試験法の開発に関する研究

(略)

（事務局注）平成15年6月の検討において、メチル水銀量と総水銀量が逆転するなど、さらなる調査が必要とされた銀ダラ、メヌケ等を対象に実施。

II. 水銀試験法の開発に関する研究

A. 研究目的

魚介類中の総水銀の分析法は環流式湿式分解-還元酸化原子吸光光度法が採用されている。水銀の場合、一般に用いられる高温のフレイム原子吸光光度法を用いるより還元酸化または加熱酸化したのち、室温の吸収セル中に水銀蒸気を導入する冷原子吸光光度法の法が著しく感度が高い。

メチル水銀に関しては塩酸酸性ベンゼン抽出-システイン転溶-塩酸酸性ベンゼン再抽出/パックドカラム-ECD-GC (公定法: 直接抽出法) が一般的に行われている。しかしながら、直接抽出法は試料を固形物のまま抽出するため、ブレンダー等で出来るだけ表面積を大きくする必要がある。また、脂肪が多い試料では抽出過程でエマルジョンを形成し、抽出効率が低下する懸念がある。これらを改善する方法にアルカリ分解-ジチゾン抽出法がある。そこで、直接抽出法とアルカリ分解-ジチゾン抽出法を比較検討した。

昨年度に引き続きガスクロマトグラフィー (GC) 法の検討を行った。

パックドカラム仕様の GC は現在殆ど生産されていない。ECD 検出器にパックドカラムを装着すると、カラム中の液相が溶出し、ECD 検出器が汚れピークのドリフト等がおこり、正確な定量が困難になる。そこで、パックドカラムをキャピラリーカラムに変更して高感度、高精度のメチル水銀の測定法を開発する。

B. 研究方法

1. 試薬・試料

試料: 濃度の異なる 2 種類のマグロ試料のマグロについてメチル水銀を測定した (n=5) (表 1)。

試薬: ①硫酸: 精密分析用、②硝酸: 有害金属測定用、③過塩素酸: 特級、④尿素溶液 (10%): 特級尿素 50 g を水に溶かして 500mL とする。⑤硫酸溶液 [硫酸 (1+1)]: 水 250mL をビーカーにとり、これを冷却し、かき混ぜながら精密分析用硫酸

250mL を徐々に加える。⑥還元液 [塩化すず (II) 溶液]: 精密分析用塩化第一すず (2 水塩) 10 g に硫酸 (1+20) 60mL を加え、かき混ぜながら溶かして水で 100mL とする。⑦水銀標準液 (10 μ g Hg/mL): 原子吸光分析用水銀標準原液 1000 ppm (2mL を 200mL のメスフラスコにとり、硝酸 5 mL を加え、水を標線まで加える。⑧校正用水銀標準液 (0.1 μ g Hg/mL): 100mL のメスフラスコに約 80mL の水を入れ、硫酸 (1+1) 5mL を加えたのち、水銀標準液 (10 μ g Hg/mL) 1mL をとり、水を標線まで加える。本液 1mL は水銀 100ng を含む。

⑨L-システイン・酢酸ナトリウム溶液: 特級L-システイン塩酸塩一水和物 1.0 g、特級酢酸ナトリウム三水和物 0.8 g 及び一級硫酸ナトリウム (無水) 12.5 g を水に溶かして 100mL とする。(使用時に調製する) ⑩塩化メチル水銀標準原液: 市販の塩化メチル水銀 (II) 10 μ g/mL (Hg として) ベンゼン溶液を用いる。検量線: 上記の標準原液をベンゼンで希釈し、0.005~0.1 μ g/mL の標準溶液を段階的に調製する。⑪0.1%ジチゾン・ベンゼン溶液: 粉末状のジチゾン 0.55g をベンゼン 500mL に溶解させたのち、1mol/L NaOH 100mL で 2 回抽出する。水層を合わせ HCl を加え中性から弱酸性とし、ベンゼン 500mL に転溶させて 0.1%、1%ジチゾン・ベンゼン溶液を調整する (冷暗所に保存)。

2. 装置及び器具

1) 総水銀

水銀測定装置: 平沼産業社製

2) メチル水銀

Me-Hg (パックドカラム)

GC: 日立 263-50 (ECD); カラム: 3mmI.D. x 1m ; 充填剤: 10% Thermon-Hg Chromosorb W 80/100 AW-DMCS 1m; カラム温度: 165°C; 注入口温度: 200°C; 検出器温度: 200°C; キャリアーガス: N₂ (50mL/min)

Me-Hg (キャピラリーカラム)

GC: Agilent Technologies 6890N (ECD); カラム: ULBON HR-Thermon-Hg, 0.53mmI.D. x 15m; カラム

温度：160℃；注入口温度：200℃；検出器温度：230℃；キャリアーガス：He (10mL/min)

3. 分析方法

1) 総水銀

試料を酸分解した後、塩化すず(II)で水銀(II)を還元する。この溶液に通気して発生する水銀蒸気による原子吸光を波長235.7nmで測定し、水銀を定量する、還元気化原子吸光法で測定した(図1)。

2) メチル水銀

直接抽出法：試料10g(0.01gまで)をビーカー50mLに採取し、水20mLを加えディスペーサーでホモジナイズする。このビーカーの試料及びディスペーサーに付着した試料を35mLで分派ロート(300mL)に洗いこみ、さらに濃塩酸14mL、塩化ナトリウム10g、ベンゼン70mLを加え約5分間激しく振り混ぜたものを350mL遠沈管に移し変え3000回転10分間遠心分離する。遠沈管のベンゼン層(上層)40mLを100mL分派ロートに分取し、中性になるまで4~5回20%NaCl溶液で水洗する。これにL-システイン溶液6mLを加え2分間振とうし10分間以上静置する。この水層2mLを100mLの分派ロートに分取し、さらに6N塩酸1.2mL、ベンゼン4mLを加え10分間振り混ぜる。10分間静置した後、水層を捨て、ベンゼン層を脱水して共栓付き試験管に移し、試験液とする(図2)。

アルカリ分解—ジチゾン抽出法：細切した試料10gを50mLネジロ遠沈管に秤取し、1mol/LKOH・エタノール20mLを加えて密栓し沸騰水浴上で1時間加熱する。冷後1mol/LHCl20mL、10%EDTA・4Na₂2mLおよびヘキサン5mLを順次加えて数分間振とうする。遠心分離後、ヘキサン層を除去し、0.05%ジチゾン・ベンゼン溶液10mLを加えて振とう抽出する。下層をすて、ベンゼン層を水30mLで洗浄し、さらに1mol/LNaOH10mLで2回洗浄した後、ベンゼン層4mLをネジロ小試験管に移し、0.02%アルカリ性硫化ナトリウム溶液2mLを加えて逆抽出する。上層はすて、下層にベンゼン2mLを加えて振とうする。ベンゼン洗液を除去し、下層に先端を細くしたガラス管を用いてN₂ガスをゆるやかに通じながら、液相が青紫

色を呈するまで1mol/LHClを滴下し、さらに3分間通気する。次いでWalpole緩衝液5mLおよび0.05%ジチゾン・ベンゼン溶液2mLを加えて振とう抽出する。ベンゼン層を1mol/LNaOH4mLで2回洗浄後、少量の無水Na₂SO₄を加えて脱水し、試験溶液とする(図3)。

C. 結果及び考察

1. 還元気化原子吸光法による総水銀の添加回収率

総水銀汚染の無いイワシを用いて添加回収実験(n=5)を行った。その結果、総水銀の回収率は94.4%であった(93.4%~95.6%)表2。

2. 魚類中の総水銀及びメチル水銀の分析結果

日本で食されている6種類(銀ダラ、アラスカメヌケ、本メヌケ、キンメダイ、トチザメ、シロザメ(4試料))の魚類について総水銀及びメチル水銀を測定した。

1) 還元気化原子吸光法を用いて魚類6魚種34試料の総水銀を測定した結果を表3に示した。

各魚類中総水銀濃度の平均値は銀ダラ(7試料)0.22mg/kg(0.04~0.47)、アラスカメヌケ(3試料)0.31mg/kg(0.11~0.49)、本メヌケ(7試料)0.38mg/kg(0.26~0.56)、キンメダイ(10試料)0.55mg/kg(0.34~1.1)、トチザメ(3試料)0.47mg/kg(0.33~0.69)、シロザメ(4試料)0.06mg/kg(0.05~0.1)であった。

2) メチル水銀(水銀として)の実態調査は、

各魚類のメチル水銀濃度の平均値は、銀ダラ(7試料)0.18mg/kg(0.03~0.37)、アラスカメヌケ(3試料)0.21mg/kg(0.08~0.31)、本メヌケ(7試料)0.27mg/kg(0.17~0.45)、キンメダイ(10試料)0.48mg/kg(0.27~0.83)、トチザメ(3試料)0.41mg/kg(0.30~0.61)、シロザメ(4試料)0.05mg/kg(0.04~0.08)であった(表3)。

本結果からシロサメ以外の魚種では、メチル水銀が比較的高濃度含まれていることが明らかになった。

トチザメに較べて低いメチル水銀値を示したシロザメの魚体重平均値は0.70kgであり、トチザメ

の (3.9kg) にくらべて魚体重量が低かった。

3. マグロ中のメチル水銀/総水銀比 (%)

銀ダラ (7 試料: 平均値) 79.7%、アラスカメヌケ (3 試料) 69.3%、本メヌケ (7 試料) 70.1%、キンメダイ (10 試料) 87.6%、トチザメ (3 試料) 87.0%、シロザメ (4 試料) 85.0%で、総水銀の約 70%以上がメチル水銀で、マグロの値とよく一致していた(表 3)。

4. メチル水銀分析におけるキャピラリーカラムの検討

ULBONHR-Thermon-Hg (0.53mm×15m) キャピラリーカラムを用いてメチル水銀のカラム分離及びピーク形状等を検討した結果、本カラムは分離及びピーク形状等、メチル水銀測定に十分適用できることが明らかになった。検量線も 0.05ppm~0.1ppm の範囲で良好な直線性 ($R^2=0.9999$) が得られた。

銀ダラ、キンメダイ、サメ等計 34 試料について試料についてパックドカラム法及びキャピラリーカラム法によりメチル水銀の定量を試みた。

両測定値の相関係数は $R^2=0.991$ でキャピラリー法は従来法 (公定法) とよく一致した。この結果は、食品中のメチル水銀測定においてキャピラリーカラム-ECD-GC の可能性を示唆するものである。

5. メチル水銀の分析法の比較検討

メチル水銀に関しては塩酸酸性ベンゼン抽出-システイン転溶-塩酸酸性ベンゼン再抽出/パックドカラム-ECD-GC (公定法: 直接抽出法) が一般的に行われている。しかしながら、直接抽出法は試料を固形物のまま抽出するため、ブレンダー等で出来るだけ表面積を大きくする必要がある。また、脂肪が多い試料では抽出過程でエマルジョンを形成し、抽出効率が低下する懸念がある。これらを改善する方法にアルカリ分解-ジチゾン抽出法がある。そこで、直接抽出法とアルカリ分解-ジチゾン抽出法を比較検討した。

1) 添加回収実験

市販のイワシにメチル水銀を添加 (試料換算で 0.1ppm) した試料について直接抽出法とアルカリ分解-ジチゾン抽出法で回収率を検討した。その結果、回収率は直接抽出法で 101%、アルカリ分

解-ジチゾン抽出法で 102%というように両者の分析法に差は認められなかった (表 4)。

メチル水銀濃度の高いマグロ試料 (n=5) と低いマグロ試料 (n=5) についても分析法による抽出効率を検討した。

高濃度実試料では直接抽出法で $4.6\text{ppm}\pm 0.216$ 、アルカリ分解-ジチゾン抽出法で $4.6\text{ppm}\pm 0.228$ 、低濃度実試料では直接抽出法で $0.37\text{ppm}\pm 0.016$ 、アルカリ分解-ジチゾン抽出法で $0.33\text{ppm}\pm 0.023$ 、というように両者の分析法に大差は認められなかった。以上の結果、魚類試料のメチル水銀抽出にはどちらの抽出法を用いても差異がないことが明らかになった (表 5)。

D. 結論

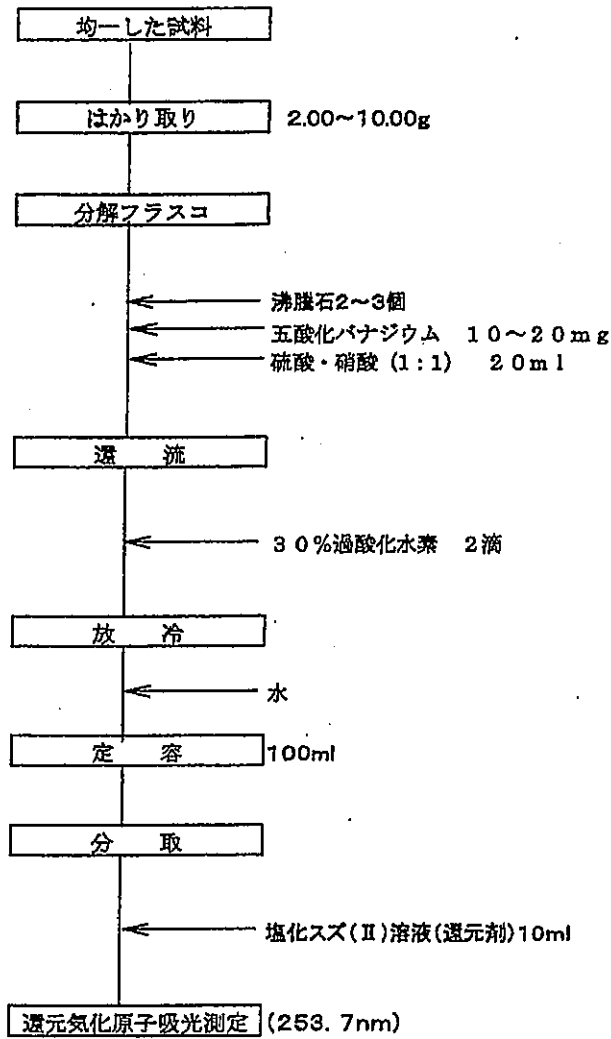
1. 従来法を用いて総水銀及びメチル水銀の測定を行った。
2. メチル水銀については、従来法のパックドカラム ECD/GC 法よりより精密なキャピラリーGC/MS 法を開発した。従来法との比較検討の結果、両分析法の間に高い相関が認められた。
3. 各魚類のメチル水銀濃度 (水銀として) の平均値は、銀ダラ (7 試料) 0.18 mg/kg (0.03~0.37)、アラスカメヌケ (3 試料) 0.21 mg/kg (0.08~0.31)、本メヌケ (7 試料) 0.27 mg/kg (0.17~0.45)、キンメダイ (10 試料) 0.48 mg/kg (0.27~0.83)、トチザメ (3 試料) 0.41 mg/kg (0.30~0.61)、シロザメ (4 試料) 0.05 mg/kg (0.04~0.08) であった。
4. メチル水銀の分析法の比較検討を行った結果、魚類試料のメチル水銀抽出には直接抽出法、アルカリ分解-ジチゾン抽出法の間には差異がないことが明らかになった。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

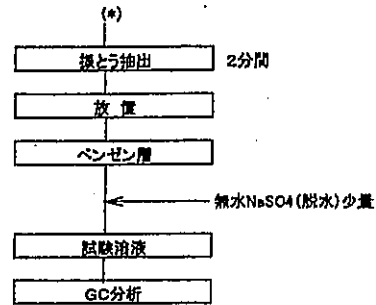
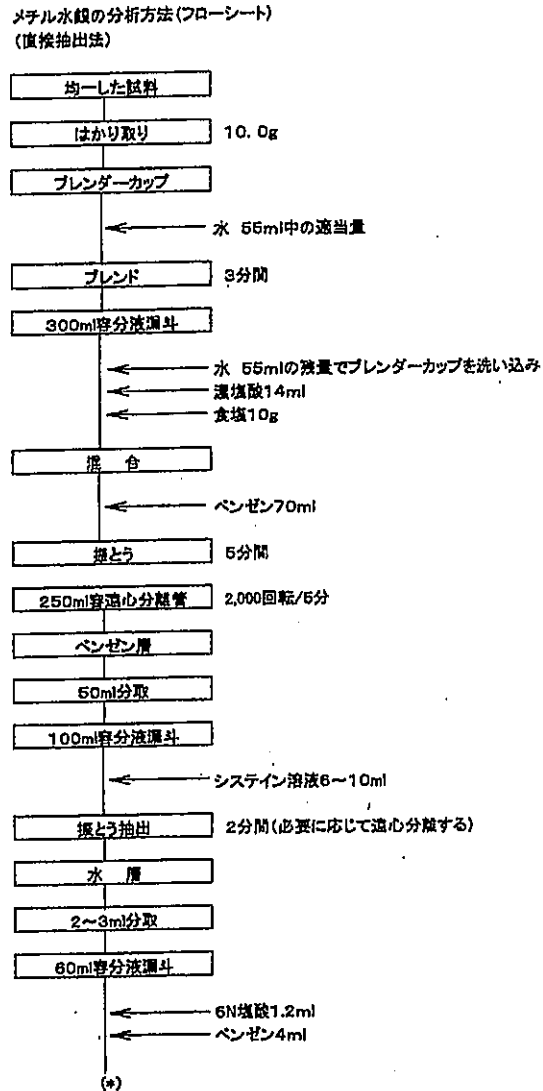
F. 知的所有権の取得状況
なし

図1 総水銀の分析方法 (フローシート)



(参考文献:AOAC Official Method 977.15 Mercury in Fish)

図2 メチル水銀の分析方法(フローシート)
(直接抽出法)

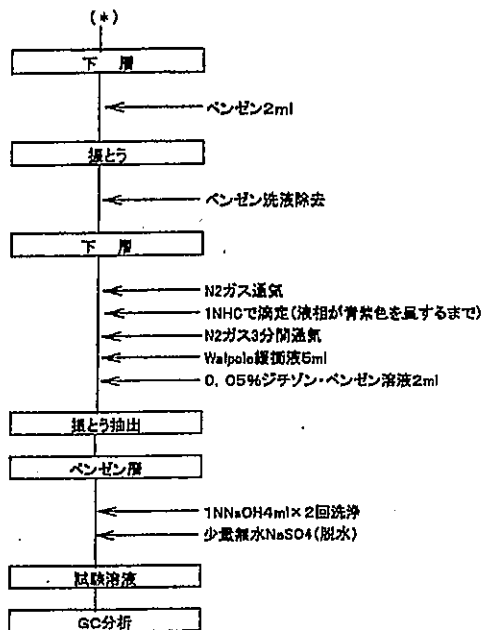
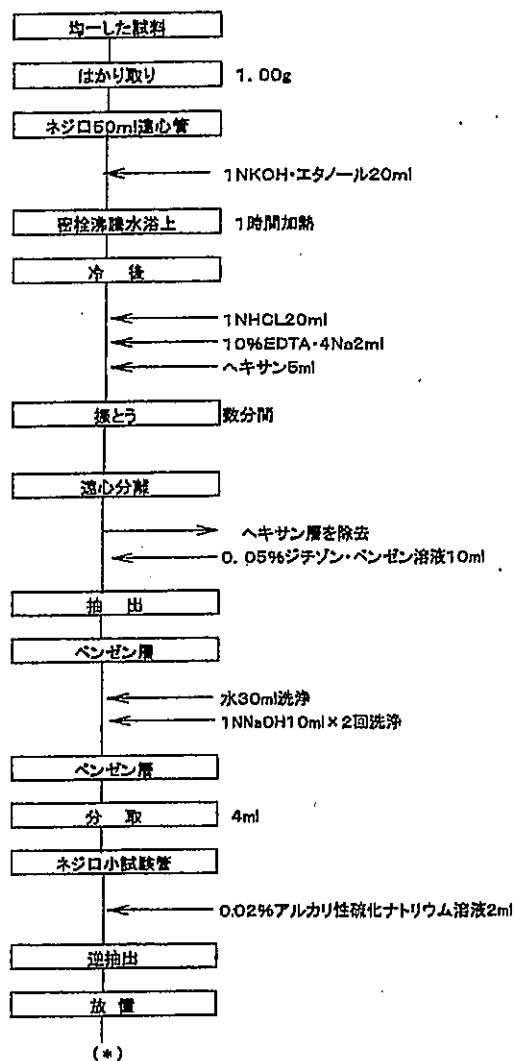


① ハットカラム条件
DEGS-HG, Thermo-HG (2.0*1.1, 1.5m)
chromosorb W/AW-DEGS20% 800/100.

② キャピラリーカラム条件
ULBON HR
Thermo-HG (0.53*15m)

(参考文献; 食品衛生検査指針 理化学編 1981年page108-102)

図3 メチル水銀の分析方法(フローシート)
(アルカリ分解-ジチゾン抽出法)



① パックカラム条件
HG-20A (2.0*1.0~1.0m)
Uniport HP 800/100.

(参考文献: 衛生試験法・注解 1990版 付録箱(1995)page626~628)

表1 検体明細表

検体記号	魚種名	重さ
A-1	銀ダラ	1.9kg
A-2	銀ダラ	1.85kg
A-3	銀ダラ	2.75kg
A-4	銀ダラ	2.93kg
A-5	銀ダラ	2.33kg
A-6	銀ダラ	2.5kg
A-7	銀ダラ	1.78kg
B-1	アラスカメヌケ	900g
B-2	アラスカメヌケ	600g
B-3	アラスカメヌケ	760g
B-4	本メヌケ	1.85kg
B-5	本メヌケ	1.4kg
B-6	本メヌケ	2.15kg
B-7	本メヌケ	2.9kg
B-8	本メヌケ	2.8kg
B-9	本メヌケ	3kg
B-10	本メヌケ	2.25kg
C-1	キンメダイ	536g
C-2	キンメダイ	495g
C-3	キンメダイ	497g
C-4	キンメダイ	650g
C-5	キンメダイ	421g
C-6	キンメダイ	685g
C-7	キンメダイ	457g
C-8	キンメダイ	465g
C-9	キンメダイ	952g
C-10	キンメタイ	0.61kg
D-1	トチザメ	2.8kg
D-2	トチザメ	2.0kg
D-3	トチザメ	7.0kg
D-4	シロザメ	0.69kg
D-5	シロザメ	0.67kg
D-6	シロザメ	0.74kg
D-7	トチザメ	2.5kg

表2. 総水銀の添加回収 (%)

試料番号	総水銀 添加回収 (%)
No. 1	93.4
No. 2	93.4
No. 3	95.5
No. 4	93.9
No. 5	95.6

1) 添加量 総水銀試料換算0.1ppm

2) 市販品の鰯 総水銀検出せず (d10.01ppm)

表3 魚類中の総水銀及びメチル水銀濃度 (ppm)

検体番号	魚種名	メチル水銀 (水銀換算)		総水銀	Hgとして CH ₄ Hg/Hg (%)
		パットカラム	キャピラカラム		
A-1	銀ダラ	0.04	0.03	0.04	100.0
A-2	銀ダラ	0.03	0.03	0.04	75.0
A-3	銀ダラ	0.37	0.32	0.47	78.7
A-4	銀ダラ	0.37	0.37	0.46	80.4
A-5	銀ダラ	0.34	0.27	0.44	77.3
A-6	銀ダラ	0.04	0.03	0.06	66.7
A-7	銀ダラ	0.04	0.04	0.05	80.0
B-1	アラスカメヌケ	0.23	0.21	0.32	71.9
B-2	アラスカメヌケ	0.08	0.07	0.11	72.7
B-3	アラスカメヌケ	0.31	0.29	0.49	63.3
B-4	本メヌケ	0.26	0.23	0.4	65.0
B-5	本メヌケ	0.24	0.22	0.4	60.0
B-6	本メヌケ	0.17	0.16	0.26	65.4
B-7	本メヌケ	0.24	0.21	0.33	72.7
B-8	本メヌケ	0.31	0.28	0.43	72.1
B-9	本メヌケ	0.45	0.43	0.56	80.4
B-10	本メヌケ	0.21	0.19	0.28	75.0
C-1	キンメダイ	0.41	0.37	0.45	91.1
C-2	キンメダイ	0.46	0.39	0.52	88.5
C-3	キンメダイ	0.57	0.46	0.62	91.9
C-4	キンメダイ	0.39	0.32	0.42	92.9
C-5	キンメダイ	0.27	0.23	0.34	79.4
C-6	キンメダイ	0.39	0.34	0.45	86.7
C-7	キンメダイ	0.43	0.37	0.46	93.5
C-8	キンメダイ	0.37	0.27	0.45	82.2
C-9	キンメダイ	0.83	0.72	1.1	75.5
C-10	キンメタイ	0.64	0.56	0.68	94.1
D-1	トチザメ	0.31	0.22	0.38	81.6
D-2	トチザメ	0.61	0.46	0.69	88.4
D-3	トチザメ	0.3	0.26	0.33	90.9
D-4	シロザメ	0.04	0.04	0.05	80.0
D-5	シロザメ	0.05	0.05	0.05	100.0
D-6	シロザメ	0.08	0.06	0.1	80.0
D-7	シロザメ	0.04	0.04	0.05	80.0

表4 メチル水銀の添加回収 (%)

試料番号	メチル水銀(添加回収率%)	
	直接抽出法	アルカリ分解—ジチゾン抽出法
No. 1	105	100
No. 2	100	104
No. 3	100	102
No. 4	100	109
No. 5	98.1	96.6

1) 冷加量：試料換算0.1ppm(塩化メチル水銀として)

2) 市販品の鯛：メチル水銀0.02ppm含有

表5 実試料を用いたメチル水銀の抽出法の検討(ppm)

試料番号	直接抽出法	アルカリ分解— ジチゾン抽出法
No. 1(数値の高い魚種)	4.7	4.8
No. 2(同上)	4.4	4.3
No. 3(同上)	4.9	4.4
No. 4(同上)	4.5	4.8
No. 5(同上)	4.4	4.6
平均値	4.58	4.58
No. 1(数値の低い魚種)	0.34	0.36
No. 2(同上)	0.37	0.31
No. 3(同上)	0.38	0.31
No. 4(同上)	0.37	0.35
No. 5(同上)	0.38	0.32
平均値	0.368	0.33