

技術論文

HPLC と冷蒸気原子蛍光分析を用いる生物試料中の水銀種分別定量

林 健太郎¹, 大迫 譲滋¹, 中島 常憲¹, 高梨 啓和¹, 大木 章^{®1}

海産食品などの生物試料中に含まれる水銀種について、HPLC、UV 照射による酸化分解、及び冷蒸気原子蛍光分析を組み合わせた方法 (HPLC-UV-CVAFS) により分別定量を行った。まず、生物試料中からの水銀種の抽出法について検討し、メルカプト基をもつ化合物である 2-メルカプトエタノール (2-ME) が、抽出剤として効果的であることが分かった。CH₃Hg⁺濃度の認証値をもつ 3 種の認証標準物質について、2-ME 溶液による抽出と HPLC-UV-CVAFS により測定を行い、認証値と測定値がほぼ一致することを確認した。マグロ類などの海産食品試料 (実試料) について、同様の分析を行った。抽出溶液について、HPLC-UV-CVAFS 測定によって得られる CH₃Hg⁺濃度と Hg²⁺濃度の合計値が、加熱酸化原子吸光分析 (HVAAS) によって得られる値 (総水銀濃度) とほぼ一致した。すなわち、海産食品等の生物試料について、2-ME 抽出によって得られる抽出液を HPLC-UV-CVAFS 測定することにより、水銀種の分別定量が効果的に行えることが分かった。

1 緒 言

水銀は最も毒性の高い元素の一つであるが、特にメチル水銀 (CH₃Hg⁺) などのアルキル水銀は猛毒であり、水環境基準等の環境基準では「検出されないこと」となっている。しかしながら、大型の海洋生物中には食物連鎖により、かなりの濃度の CH₃Hg⁺を含む水銀種が濃縮されている。特に日本人は魚などの海産食品を多食するので、海産食品中に含まれる水銀種を簡便かつ正確に分別定量することは重要である。

海産食品などの生物試料中の総水銀濃度分析であれば、加熱酸化原子吸光分析 (HVAAS) などにより測定できる。しかしながら、分別定量を行う場合は、何らかの方法で無機水銀 (Hg²⁺) と CH₃Hg⁺などのアルキル水銀を分離しなければならない。これまでに、ガスクロマトグラフィーを用いる方法や、水銀種の還元条件を調節する方法が検討されてきたが、最近では高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いる方法が注目されている¹⁾²⁾。この方法は、主として逆相系カラムを用いる HPLC によって Hg²⁺と CH₃Hg⁺などのアルキル水銀を分離し、誘導結合プラズマ-質量分析 (ICP-MS) や冷蒸気原子蛍光分析 (CVAFS) などの分析方法で水銀を検出するものである。

生物試料は通常固体であり、上記のような原子分光分析装置を検出器とする HPLC に供するためには、水銀種を固相中から水相中へ完全に抽出する必要がある。1966 年に

Westöo により強酸を用いる生物試料からの CH₃Hg⁺の抽出が報告され³⁾、その後種々の改良法が検討されてきた。しかしながら、強酸を用いる抽出では、生物試料中に含まれる水銀種の加水分解が考えられるので、よりマイルドな抽出方法が好ましい。また、抽出後の溶液が強酸性となるため、この溶液を HPLC に供するのは通常困難である。この他に生物試料からの水銀抽出について、アルカリ分解を用いる方法⁴⁾⁵⁾、酵素を用いる方法⁶⁾、トルエンを用いる方法⁷⁾などが検討された。

最近、メルカプト基をもつ化合物を抽出剤として用いると、生物試料から効果的な水銀抽出が行えることが報告されている。2-メルカプトエタノール (2-ME) 溶液を用い、マイクロ波照射支援の抽出を行う方法が検討された⁸⁾。その後、マイクロ波照射を行わなくても抽出条件を工夫すれば、2-ME 溶液を用いる抽出により、魚肉や毛髪から効果的に水銀種の回収を行えることが報告された⁹⁾¹⁰⁾。また、このような抽出剤として L-システインなども効果的であることが報告されている¹¹⁾。しかしながら、これらの研究の多くは ICP-MS を HPLC の検出器として用いるもので、CVAFS を検出器として用いる場合については十分に検討されていない。ICP-MS は、無機材料の分析・評価に不可欠な手法となっているが水銀測定については、メモリー効果を生じやすい欠点がある。また CVAFS は、多量のアルゴンガスを使用する ICP-MS に比べてランニングコスト的に有利である。ICP-MS が CVAFS に比べて有利な点としては、前処理の必要が無く、試料を直接機器に導入するため、HPLC と ICP-MS を直結できることである。CVAFS の場合には、アルキル水銀種を Hg²⁺に分解するために、通常は

[®] E-mail: ohki@apc.kagoshima-u.ac.jp

¹ 鹿児島大学大学院理工学研究科化学生命・化学工学専攻: 890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元 1-21-40

Table 1 Total Hg concentration in certified reference materials

Sample	Certified/ $\mu\text{g g-dry}^{-1}$	Measured ^{a)} / $\mu\text{g g-dry}^{-1}$
DORM-2	4.64 \pm 0.26	4.50 \pm 0.09
DOLT-3	3.37 \pm 0.14	3.35 \pm 0.19
NMIJ-7402a	0.61 \pm 0.02	0.60 \pm 0.04

a) Measured by HVAAS.

UV照射下で酸化分解を行う装置がHPLCの後段に必要となる。すなわち、HPLC、UV酸化分解装置、CVAFSの結合(HPLC-UV-CVAFS)が必要となる。これはHPLC-ICP-MSに比べて、試料溶液中に含まれる共存物の影響を受けやすい可能性があるが、このような検討はいまだ不十分である。また、これまでの研究において主として使用された生物試料は認証標準物質であり、実際の海産食品試料への適用は検討例が少なく、実試料の海産物について検討された場合でも、単に CH_3Hg^+ の濃度を測定しているだけであり、全水銀量との比較を行いその値の妥当性を検討している例はほとんどない。特に、日本において多食される種類の海産食品に含まれる水銀種の分別定量にHPLC-UV-CVAFSが用いられた例は、これまでにない。

本研究では、2-MEなどの抽出剤溶液による水銀抽出とHPLC-UV-CVAFSを用いて、魚肉など生物試料中の水銀種の分別定量を試みた。試料としては、認証標準物質のみならず、実試料として、日本人が多食する市販の海産食品試料も含めて検討を行った。特に、実試料については公定法のHVAASを用いて総水銀濃度を測定し、この全量値と、分別定量で得られた値の合計値を比較するという手段で、後者の実用性を評価した。

2 実験

2.1 試料及び試薬

認証標準物質であるDORM-2(サメ筋肉)及びDOLT-3(サメ肝臓)はカナダ国立研究機構から、NMIJ-7402a(タラ魚肉)は(独)産業技術総合研究所より入手した。海産食品の実試料として、ミンククジラ、バンドウイルカ、ミナミマグロ、キハダマグロ、メバチマグロ、サバ、イサキの筋肉部を用いた(キハダマグロは内臓部も試料とした)。これらの試料は、近隣のスーパーマーケットまたはインターネットを利用して生鮮食品業者より購入した。凍結乾燥を行い、自動粉砕機を用いて粉砕したのち、ふるいにかけて、乾燥試料とした。超純水は、Purelab Ultra Ionic(オルガノ製)を用いて製造し、すべての実験を通して使用した。2-ME(純度98.5%)、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS, 純度95%)は和光純薬工業製、酵素(サブチリシン)はSigma-Aldrich製を用いた。各試薬は試験研究用特級に相当するグレードのものを使用した。

2.2 試料中の総水銀濃度分析

生物試料中の総水銀濃度測定は、HVAAS装置(日本インスツルメンツ製, MA-2000)によって行った。分析は、装置のプロトコルに従って、試料ポットに試料及び和光純薬工業製の添加剤M(組成: 活性アルミナ)、B(組成: 水酸化カルシウム、炭酸ナトリウム)を入れて行った。測定は、同一試料について少なくとも3回行い、平均値を求めた。

2.3 試料からの水銀種の抽出

生物試料からの水銀種の抽出剤水溶液は筋タンパクの分解等を目的として、界面活性剤水溶液(sodium dodecyl sulfate, SDS)、タンパク質分解酵素であるサブチリシン、及び2-ME溶液の3種を試みた。共栓付き試験管に試料乾燥粉末約0.1gを精秤して入れ、抽出剤の水溶液10mLを加えて、12h振とうした。遠心分離後、0.45 μm メンブレンフィルターを用いて濾過を行い、濾液(抽出溶液)について以降の実験に供した。抽出操作は、同一試料について少なくとも3回行った。

2.4 抽出溶液中の総水銀濃度測定と水銀分別定量

抽出溶液中の総水銀濃度測定をHVAASにより行い、抽出剤による水銀抽出率を求めた。HPLCシステムはRheodyne製インジェクター(7725i, サンプルループ200 μL)とJASCO PU-2080ポンプにより構成されており、水銀種の分離はODSカラム(和光純薬工業製, Wakosil-II 5C18 HG, 4.6mm \times 150mm)及び溶離液(メタノール: 水=1:9, 0.01% 2-MEを含む)を用い、流量0.85mL min^{-1} を用いて行った。 CH_3Hg^+ の Hg^{2+} への光酸化は、酸化剤水溶液[0.14% KBrO_3 (m/v), 0.5% KBr (m/v), 2M HCl]を用いてPSA 10.570 UV-oxidation system (PS Analytical製)により行った。また、CVAFS測定は、PSA 10.025 Millennium (PS Analytical製)を用いて行った。

3 結果と考察

3.1 生物試料中の総水銀濃度測定

3種の認証標準物質(DORM-2, DOLT-3, NMIJ-7402a)について、HVAASによる総水銀濃度の測定を行った。Table 1に示すように、測定値は認証値とよい一致を示しており、HVAASによりこれらの生物試料中の総水銀濃度を正確に測定できることが分かった。

HVAASを用いて、魚肉など種々の海産食品に含まれる総水銀濃度測定を行った。Table 2にその結果を示す。ミナミマグロ(southern bluefin tuna)、キハダマグロ(yellowfin tuna)及びその内臓、サバ(mackerel)については、それぞれ2種の個体について水銀濃度測定を行った。歯鯨類であるイルカや大型魚類であるマグロ類が、筋肉中に高い水銀を含んでいることはよく知られているが、バンドウイ

Table 2 Total Hg concentration in biological samples

Sample ^{a)}	Total Hg concentration ^{b)} / μg g-dry ⁻¹
Minke whale	0.07 ± 0.02
Bottlenose dolphin	5.40 ± 0.30
Southern bluefin tuna-1	1.67 ± 0.12
Southern bluefin tuna-2	4.01 ± 0.22
Yellowfin tuna-1	0.12 ± 0.02
Yellowfin tuna-2	0.59 ± 0.04
Yellowfin tuna-1 (entrails)	0.35 ± 0.02
Yellowfin tuna-2 (entrails)	0.76 ± 0.06
Bigeye tuna	1.04 ± 0.10
Mackerel-1	1.09 ± 0.13
Mackerel-2	0.45 ± 0.03
Chicken grunt	0.24 ± 0.03

a) Muscular tissue except for noted. b) Measured by HVAAS.

Table 3 Extraction of Hg from biological samples by extractant solutions

Sample	Extraction ratio of Hg / %		
	SDS ^{a)}	Subtilisin ^{b)}	2-ME ^{c)}
DOLT-3	5 ± 2	38 ± 4	103 ± 6
Southern bluefin tuna-1	4 ± 1	77 ± 6	97 ± 4

a) 1.0 % SDS; b) 1.0 % subtilisin, 1 M Tris-HCl; c) 0.10 % 2-ME, 0.15 % KCl, 0.10 % HCl.

ルカ (bottlenose dolphin) やミナミマグロは高い水銀濃度を示した。メバチマグロ (bigeye tuna) も 1.0 μg g-dry⁻¹ 以上の水銀濃度をもっていたが、キハダマグロの水銀濃度は比較的良かった。キハダマグロについては、内臓中の水銀濃度も調べたが、これは筋肉中に比べてやや高かった。中型魚類は、大型魚類に比べて筋肉中の水銀濃度が低いことが知られており、サバ (mackerel-2) やイサキ (chicken grunt) は比較的低い水銀濃度を示した。しかしながら、サバの別個体 (mackerel-1) はマグロ類に匹敵する水銀濃度をもっていた。

3・2 生物試料からの水銀種の抽出

海産食品のような生物試料中の水銀種について、分別定量を行う場合には、まず生体高分子マトリックス中に存在する水銀種を、適当な抽出剤を用いて、化学的変化をさせずに抽出しなければならない。このような抽出剤として、界面活性剤 (SDS)、酵素 (サブチリシン)、及びメルカプト化合物 (2-ME) の3種を試みた。DOLT-3及びミナミマグロ (southern bluefin tuna-1) について、これらの抽出剤の使用を試みた結果を Table 3 に示す。水銀抽出率は、DOLT-3 の場合は認証値を、ミナミマグロの場合は HVAAS 測定により得られた値を基準にして求めた。DOLT-3 及びミナミマグロの両方について、良好な水銀抽出率を示すのは 2-ME 溶液のみであった。2-ME のようにメルカプト基を

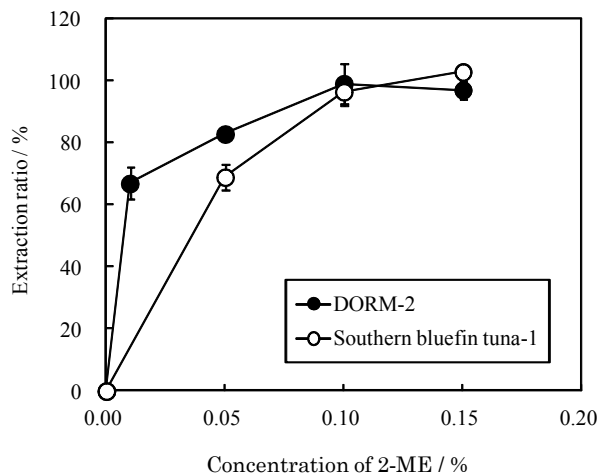


Fig. 1 Extraction of Hg from biological samples by a 2-ME solution

Table 4 Extraction of Hg from biological samples by a 2-ME solution ^{a)}

Sample	Total Hg in extraction solution / μg L ⁻¹	Extraction ratio of Hg / %
DORM-2	46.3 ± 3.1	100 ± 7
DOLT-3	34.8 ± 1.9	103 ± 6
NMIJ-7402a	5.7 ± 0.2	93 ± 3
Bottlenose dolphin	44.8 ± 2.8	83 ± 5
Southern bluefin tuna-1	16.2 ± 0.6	97 ± 4
Bigeye tuna	9.9 ± 0.7	95 ± 7
Mackerel-1	11.8 ± 1.0	108 ± 9

a) 0.10 % 2-ME, 0.15 % KCl, 0.10 % HCl.

もつ化合物は、タンパク質の三次構造を形成するジスルフィド結合を切断でき、また抽出された水銀種に配位することにより安定化できるため、高い水銀抽出率を示すと考えられる。

2-ME 溶液を用いる生物試料中からの水銀種の抽出において、2-ME の最適濃度を検討した。Fig. 1 に、DORM-2 及びミナミマグロ (southern bluefin tuna-1) についての結果を示すが、両者の場合とも 0.10 % 以上の 2-ME 濃度で、ほぼ完全な抽出を示した。以上の結果より、以降の実験では 0.10 % 2-ME 溶液を用いて、実試料からの水銀抽出を行った。

種々の海産食品試料について、2-ME 溶液による水銀種の抽出を試み、HVAAS による測定を行い水銀の抽出率を求めた。Table 4 に示すように、3 種の認証標準物質及び 4 種の実試料について検討したが、83 ~ 108 % の抽出率であった。個々の試料によりタンパク質マトリックス等が異なるために、回収率に若干のばらつきが見られたと考えられるが、生物試料について、2-ME 抽出により定量的に水銀抽出が可能であることが分かった。

Table 5 Fractional determination of Hg in certified reference materials

Sample	CH ₃ Hg ⁺		Hg ²⁺
	Certified/ μg g-dry ⁻¹	Measured/ μg g-dry ⁻¹	Measured/ μg g-dry ⁻¹
DORM-2	4.47 ± 0.32	4.39 ± 0.44	n.d. ^{a)}
DOLT-3	1.59 ± 0.12	1.55 ± 0.08	1.67 ± 0.11
NMIJ-7402a	0.58 ± 0.02	0.53 ± 0.02	n.d. ^{a)}

a) Not detected.

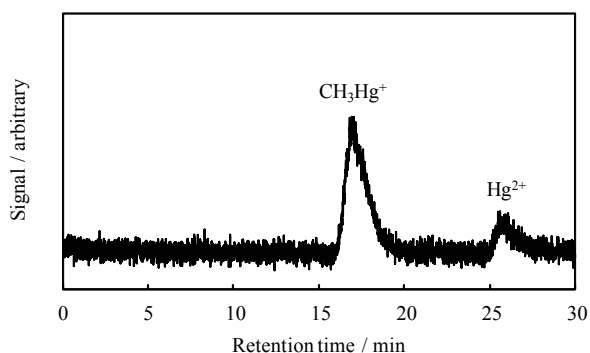


Fig. 2 Chromatogram of Hg species in HPLC-UV-CVAFS for southern bluefin tuna-1

3.3 生物試料中に含まれる水銀種の分別定量

3種の認証標準物質 (DORM-2, DOLT-3, NMIJ-7402a) について、2-ME抽出で得られた抽出溶液を、HPLC-UV-CVAFS測定に供し、水銀分別定量を行った。測定された抽出溶液中のCH₃Hg⁺濃度及びHg²⁺濃度を試料中濃度に換算した結果をTable 5に示す。これらの認証標準物質は、CH₃Hg⁺濃度の認証値をもっているが、得られた測定値は認証値に近い値であった。DORM-2及びNMIJ-7402aにはHg²⁺はほとんど含まれていないが、DOLT-3にはかなり含まれていた。DOLT-3にはHg²⁺濃度の認証値はないが、総水銀濃度の認証値 (3.37 μg g-dry⁻¹) から考えて、得られたHg²⁺濃度の測定値は妥当なものと考えられる。

海産食品の生物試料についても、2-ME抽出とHPLC-UV-CVAFS測定により、水銀種の分別定量を行った。Fig. 2に、ミナミマグロ (southern bluefin tuna-1) についてのクロマトグラムを示す。CH₃Hg⁺とHg²⁺に相当するピークのみ観測され、CH₃CH₂Hg⁺などその他の水銀種のピークは見られなかった。本研究では、Table 6に示す4種の海産食品試料について水銀分別定量を行ったが、すべての試料について、クロマトグラムはFig. 2と同様にCH₃Hg⁺とHg²⁺のピークのみであった。Yinらによると、海産物の実試料中には、CH₃Hg⁺とHg²⁺以外の化学種は含まれないと報告されており⁴⁾、得られた結果は妥当なものと考えられる。Table 6に、測定された抽出溶液中のCH₃Hg⁺濃度及び

Table 6 Fractional determination of Hg in biological samples

Sample	CH ₃ Hg ⁺ / μg g-dry ⁻¹	Hg ²⁺ / μg g-dry ⁻¹	Recovery of Hg ^{a)} /%
Bottlenose dolphin	2.41 ± 0.30	1.52 ± 0.21	88
Southern bluefin tuna-1	1.25 ± 0.30	0.32 ± 0.04	97
Bigeye tuna	0.76 ± 0.04	0.34 ± 0.03	111
Mackerel-1	0.69 ± 0.07	0.35 ± 0.04	88

a) Recovery of Hg was obtained from the concentrations of Hg species in the extraction solution as follows. [Total Hg] is from Table 4.

$$\text{Recovery of Hg (\%)} = \{([\text{CH}_3\text{Hg}^+] + [\text{Hg}^{2+}]) / [\text{Total Hg}]\} \times 100$$

Hg²⁺濃度を試料中濃度に換算した結果を示す。またTable 6には、抽出溶液中の総水銀濃度 (Table 4) を基準とした水銀回収率を示す。Fig. 2のクロマトグラムに示すように、現在の分析条件では、実試料の分析におけるHg²⁺ピークのS/N比が小さく、定量限界以下の分析を行っている可能性がある。そこで、標準添加法により定量性を確認したところ、ミナミマグロ (southern bluefin tuna-1) に含まれる程度のHg²⁺濃度であれば、定量可能であることが分かった。以上の結果より、海産食品試料の2-ME抽出を行った抽出液は、すべての試料について高い回収率が得られ、またHPLC-UV-CVAFSによりCH₃Hg⁺とHg²⁺の分別定量が効果的に行えることが証明された。

4 結 言

種々の生物試料について、抽出剤溶液による水銀抽出と、HPLC-UV-CVAFSによる水銀種の分別定量を試みた。抽出剤として、界面活性剤 (SDS)、酵素 (サブチリシン)、及びメルカプト基をもつ化合物 (2-ME) を試みたが、2-MEが最も優れた水銀抽出能を示した。2-ME抽出を用いると、認証標準物質のみならず、種々の海産食品試料 (実試料) からも、満足しうる水銀抽出を行うことができた。これらの生物試料を2-ME溶液を用いて抽出した結果得られる抽出溶液について、HPLC-UV-CVAFSに供した。CH₃Hg⁺濃度の認証値をもつ3種の認証標準物質について、認証値と測定値がほぼ一致することを確認した。種々の海産食品試料 (実試料) の抽出溶液についても、HPLC-UV-CVAFSによって得られるCH₃Hg⁺濃度とHg²⁺濃度の合計値が、HVAAS測定によって得られる総水銀濃度の値とほぼ一致するので、正確な測定が行えることが証明された。すなわち、日本人が多食する海産食品試料について、2-ME抽出とHPLC-UV-CVAFS測定により、水銀種の分別定量が効果的に行えることが分かった。

文 献

- 1) Y. Gao, Z. Shi, Z. Long, P. Wu, C. Zheng, X. Hou : *Microchem. J.*, **103**, 1 (2012).
- 2) M. Leermakers, W. Baeyens, P. Quevauviller, M. Horvat : *Trends Anal. Chem.*, **24**, 383 (2005).
- 3) G. Westöo : *Acta Chem. Scand.*, **20**, 2131 (1966).
- 4) Y. Yin, J. Liu, B. He, J. Shi, G. Jiang : *J. Chromatogr. A*, **1181**, 77 (2008).
- 5) Q. Liu : *Microchem. J.*, **95**, 255 (2010).
- 6) R. Rai, W. Maher, F. Kirkowa : *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**, 1560 (2002).
- 7) E. Bramanti, C. Lomonte, M. Onor, R. Zamboni, A. D'Ulivo, G. Raspi : *Talanta*, **66**, 762 (2005).
- 8) C. S. Chiou, S. J. Jiang, K. S. K. Danadurai : *Spectrochim. Acta, Part B*, **56**, 1133 (2001).
- 9) M. Wang, W. Feng, J. Shi, F. Zhang, B. Wang, M. Zhu, B. Li, Y. Zhao, Z. Chai : *Talanta*, **71**, 2034 (2007).
- 10) S. S. de Souza, J. L. Rodrigues, V. C. O. Souza, F. Barbosa Jr. : *J. Anal. At. Spectrom.*, **25**, 79 (2010).
- 11) B. L. Batista, J. L. Rodrigues, S. S. Souza, V. C. O. Souza, F. Barbosa Jr. : *Food Chem.*, **126**, 2000 (2011).

Fractional Determination of Mercury Species in Biological Samples by Use of HPLC and Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry

Kentaro HAYASHI¹, Joji OHSAKO¹, Tsunenori NAKAJIMA¹, Hirokazu TAKANASHI¹ and Akira OHKI^{®1}

[®] E-mail : ohki@apc.kagoshima-u.ac.jp

¹ Department of Chemistry, Biotechnology, and Chemical Engineering, Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, 1-21-40, Korimoto, Kagoshima-shi, Kagoshima 890-0065

(Received July 20, 2012; Accepted October 17, 2012)

The combination of HPLC, oxidative decomposition by UV irradiation, and cold vapor atomic fluorescence spectrometry (HPLC-UV-CVAFS) was applied to the fractional determination of mercury species, which were contained in biological samples, such as seafood. Firstly, the extraction of mercury species from biological samples was studied, and it was found that 2-mercaptoethanol (2-ME), which has a mercapto group, was an effective extractant. For three certified reference materials, which have the certified values of the CH_3Hg^+ concentration, extraction by a 2-ME solution and the HPLC-UV-CVAFS measurement were carried out. It was confirmed that the measured values were about the same as the certified values. The same analytical method was applied to real seafood samples. The sum of the CH_3Hg^+ concentration and the Hg^{2+} concentration in the extraction solution, which was obtained by the HPLC-UV-CVAFS measurement, was about the same as the total mercury concentration obtained by the heat vaporization atomic absorption spectrometry (HVAAS) measurement. Therefore, it is evident that the fractional determination of mercury species in biological samples was favorably performed when the extraction solution obtained by the 2-ME extraction was analyzed by HPLC-UV-CVAFS.

Keywords: fractional determination; mercury; biological samples; HPLC; cold vapor atomic fluorescence spectrometry.