

魚介類のメチル水銀及び総水銀分析法の検証

松木 司 小中 ゆかり 松室 信宏* 福田 裕

昭和 48 年に厚生省より通知された「魚介類の水銀暫定規制値について」¹⁾に基づき、魚介類の水銀測定を行っている。その分析方法の妥当性を検証するための添加回収試験、通知された公定法には無いが当所で行っている試験操作の検証試験等を行い、次のことがわかった。

- 1 通知された公定法に準じた総水銀分析及びメチル水銀分析、当所で以前に考案されたアルキル水銀分析の各分析法において 5 試料での添加回収試験を行った。その結果、平均回収率及び併行精度は、設定した目標値(平均回収率：80～110%，併行精度：10%未満)を達成し良好な結果であった。
- 2 ECD が洗浄等で使用不可能な場合、メチル水銀分析法の代替法としてアルキル水銀分析の活用が期待できる。
- 3 これまでに報告された魚介類の総水銀とメチル水銀の測定値の差には、両分析法の回収率の差が大きく起因していると考えられる。
- 4 総水銀分析法で、検量線作成溶液と測定試料溶液の試薬由来のマトリックスを類似させることで分析精度の向上が図れる。
- 5 一連の検証の中で、通知されたメチル水銀分析法では、エチル水銀が分析できないこと、また、ベンゼン中に存在するメチル水銀が水に移行し易いことが確認された。

キーワード：魚介類，メチル水銀，総水銀，アルキル水銀

はじめに

昭和 48 年に厚生省より「魚介類の水銀暫定規制値について」¹⁾が通知され、総水銀 0.4ppm，メチル水銀 0.3ppm の暫定規制値が示された。これを超過した魚介類は流通させないよう措置することが述べられている。なお、マグロ類，内水面水域の河川産の魚介類及び深海性魚介類等は適用除外とされている。

メチル水銀の分析方法については、種々の問題点が指摘されており²⁾、近年、新しい分析法が考案され報告されている^{3), 4)}。当所においては、公定法に準じた手法を採用している。

今回、総水銀分析，メチル水銀分析及びアルキル水銀分析において、添加回収試験による検証結果、公定法には記載されていないが当所で採用している手法についての検証結果、及び新たに確認した知見、これらについて報告する。

方 法

1 試薬

(1) 標準試薬

水銀標準液(Hg として、100mg/l)，2 種アルキル水銀混合標準液(塩化メチル水銀，塩化エチル水銀各々 Hg として 10 μ g/ml ベンゼン溶液)いずれも和光純薬工業(株)製を使用した。

(2) その他の試薬

硝酸，硫酸，塩酸，過マンガン酸カリウム，塩酸ヒドロキシルアミン，塩化すず(II)二水和物は、有害金属測定用で関東化学(株)製を使用した。

塩化ナトリウム，無水硫酸ナトリウムは、残留農薬 PCB 試験用で、ベンゼンは、残留農薬試験用で和光純薬工業(株)製を使用した。

尿素は、特級で関東化学(株)製を使用した。

L-システイン塩酸塩一水和物，酢酸ナトリウム三水和物は、特級でシグマアルドリッチ・ジャパン(株)製を使用した。

2 装置及び測定条件

(1) 総水銀及びアルキル水銀分析

還元気化原子吸光度計(日本インスツルメンツ(株)製マーキュリー RA-3A)「以下、水銀計」

(2) メチル水銀分析

表 1 に示す。

*：現 衛生研究所生物科学部

表1 ガスクロマトグラフ装置及び測定条件

| | |
|--------|---|
| 装置 | (株)島津製作所製 GC-14A |
| カラム | ガラスカラム 3mm×1m, 20%DEGS-Hg on Chromosorb W80~100mesh |
| 温度 | カラム 170℃, 注入口 190℃, 検出器 240℃ |
| キャリアガス | N ₂ 50ml/min |
| 検出器 | ECD ⁶³ Ni |

3 各試験方法

総水銀分析とメチル水銀分析は、公定法に準じたものである。アルキル水銀分析とは、メチル水銀分析の手法で抽出を行い、システイン溶液で逆抽出したものを試料として総水銀分析を行い、アルキル水銀の総量を水銀濃度として求める手法である。分析法の概略を図1に示す。

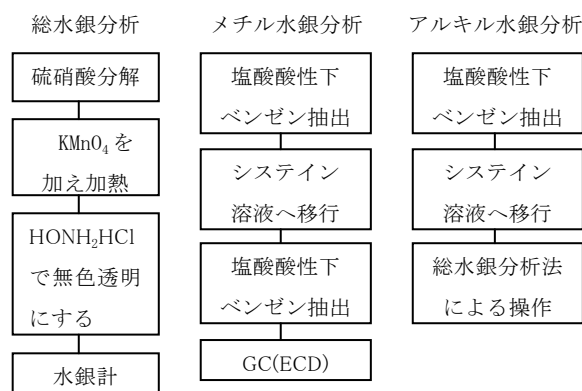


図1 分析法の概略

4 添加回収試験

(1) 総水銀分析

試料には、水銀濃度の低いカキを用いた。5 分間の水切り後フードカッターで均一液状化したものを冷凍しておき、3g ずつ5 検体を試料とした。試料を 300ml 丸底フラスコに移し自然解凍した後、各々に基準値の1/2濃度である0.2 μg/gとなるように標準溶液を添加した。標準溶液は、Hgとして100 μg/ml (以下、濃度は全て Hg として)の塩化第二水銀標準溶液を段階希釈し0.1 μg/ml 標準溶液を作成し、これを6ml ずつ検体に添加した。

硝酸 15ml と硫酸 7ml を加え還流冷却しながら 2 時間加熱した。放冷後 20%尿素溶液を 5ml 加え 30 分間同様に加熱した。放冷後、過マンガン酸カリウムを 1g 加え 30 分間同様に加熱した。フラスコ内容物を 100ml 比色管に移し、液が無色透明にな

るまで 20%塩酸ヒドロキシルアミン溶液を滴下した後、蒸留水で 100ml に定容した。これを試験溶液とし、水銀計により定量した。

(2) メチル水銀分析

総水銀と同様に処理したカキ 10g ずつ 5 検体を試料とした。試料を 250ml 遠沈管に移し自然解凍した後、各々に基準値の1/2濃度である0.15 μg/gとなるように標準溶液を添加した。標準溶液は、塩化メチル水銀、塩化エチル水銀混合標準溶液(各々、10 μg/ml ベンゼン溶液)をベンゼンで希釈し、1 μg/ml 標準溶液を作成し、これを 1.5ml ずつ検体に添加した。

蒸留水 55ml, 塩酸 14ml, 塩化ナトリウム 10g 及びベンゼン 70ml を加え 5 分間振とう後 2800rpm で 10 分間遠心分離し、40~45ml のベンゼン層を採り 100ml 分液漏斗に移した。システイン溶液(通知¹⁾のとおり作成)6ml を加え 2 分間振とう後 10 分間静置し、水層を 10ml 遠沈管に移し、3000rpm で 20 分間遠心分離し、水層 2ml を 50ml 分液漏斗分取した。6mol/l 塩酸 1.2ml, ベンゼン 4ml を加え、2 分間振とう後 10 分間静置し、水層を捨て無水硫酸ナトリウム 1g を加え脱水した。これを試験溶液とし、ECD 付きガスクロマトグラフにより定量した。

(3) アルキル水銀分析

試料採取から、標準溶液の添加、抽出を経て、水層を遠心分離するまでをメチル水銀分析と同様に処理した。水層を 3ml 分取し、以後は総水銀分析と同様に処理した。

5 実試料の分析

魚 4 検体の総水銀とメチル水銀の濃度を本法により測定した。従来より、総水銀に対するメチル水銀の割合は 75%程度であることを根拠として、総水銀濃度による安全性の評価が行われている⁵⁾。この比率と比較することで、分析技術の検証を行った。

6 公定法には無いが当所で行っている試験操作の検証

(1) 総水銀検量線作成溶液への試薬添加

検量線作成用の標準溶液は、(1+14)硫酸溶液で調整しているが、測定試料のマトリックスに近づけるため、1%過マンガン酸カリウム溶液を 1 滴加えておき、水銀計での測定直前に 20%塩酸ヒドロキシルアミンを 1 滴加えて測定している。

この操作の有用性を検証するため、標準溶液について、この操作を行ったものと、行わなかった

ものと、それぞれのピーク面積を比較した。なお、標準溶液は 1ng/ml と 5ng/ml の 2 濃度で行った。

(2) 総水銀分析での最終試験溶液の持続性

過マンガン酸カリウムを加え、加熱放冷した後、20%塩酸ヒドロキシルアミンを加え濃紫色を透明にし、水で定容後は速やかに水銀計で測定することとしている。塩酸ヒドロキシルアミンは還元剤であり、2 価の水銀が還元され気化による消失を防ぐためのものである。なお、食品分析法の文献^{2), 6)}には、水で定容後は速やかに水銀計で測定する旨の記述は無い。

この速やかさの程度を検証するため、水 50ml と硫酸 7ml を混合したものに、過マンガン酸カリウム 1g を溶解し、塩化第二水銀溶液を添加したものを 2 試料(高濃度試料として 0.20 μg/g 相当、低濃度試料として 0.02 μg/g 相当)作成し、各々 20% 塩酸ヒドロキシルアミンで試料溶液を無色透明にした後 100ml に定容し、その直後、30 分後、1, 2, 3, 4 時間後に水銀濃度を測定し時間経過による水銀濃度の変化をみた。

結果と考察

1 添加回収試験

結果を表 2 に示す。全ての項目で「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」⁷⁾にある目標値(回収率:80~110%, 併行精度:10%未満)を達成した。

メチル水銀の分析法は、ベンゼンで脂溶性のものが抽出され、その中からシステイン溶液で選択的に水銀化合物を取り出し、更にベンゼンで逆抽出するものである。従って、精製効果は高いが抽出回数 1 の抽出工程を 3 回行うことと同様であり、そのため回収率は低めになったと考えられる。

アルキル水銀分析法は、抽出がメチル水銀分析法で、その後の処理は回収率がほぼ 100%の総水銀分析法であるため、その回収率は両手法の間値になったと考えられる。

総水銀分析法の回収率が、メチル水銀分析法のそれよりも 16%高いことから、これまでに報告された魚介類の総水銀とメチル水銀の測定値の差には、両分析法の回収率の差が大きく起因していると考えられる。また、同様のことを示した報告⁸⁾もある。

メチル水銀分析の公定法では、ECD 付きガスクロマトグラフを用いて定性及び定量することになっている。この検出器は、選択性と感度に優れて

いるが²⁾、長期の使用や精製不足の試料注入により、汚れが生じ、感度低下、ピーク形状の異常が生じてくる。その際には ECD セルをメーカーに郵送し洗浄が必要となるため、その間は測定ができない。また、ECD セルには ⁶³Ni が組み込まれており、旧式の ECD セルでは、放射線取扱の法令の届出も必要となる場合もあり、その場合は更に測定不可能な期間が長くなる。

この様な場合、アルキル水銀分析法がメチル水銀分析法の代替法として活用が期待できる。

自然界で水銀より生成されるものはメチル水銀のみであり、他の有機水銀の存在は確認されていない⁹⁾。また、回収率は、アルキル水銀分析法がメチル水銀分析法より高く安全側の評価となる。これらのことから、基準を超えていない旨の判定には活用できると考えられる。

表 2 添加回収試験結果 (n=5)

| 項目 | 平均回収率(%) | 併行精度(%) |
|----------|----------|---------|
| 総水銀分析 | 99.8 | 0.5 |
| アルキル水銀分析 | 89.2 | 0.8 |
| メチル水銀分析 | 83.7 | 2.7 |

2 実試料の分析

結果を表 3 に示す。メチル水銀の総水銀に対する比率は、概ね 75%に近い値となった。この 75%と言われている値には、前述のとおり、各々の分析法の回収率の差が大きく起因していると考えられる。

表 3 実試料の分析結果

| 試料 | メチル水銀 (μg/g) | 総水銀 (μg/g) | メチル水銀/総水銀 |
|--------|--------------|------------|-----------|
| クロダイ 1 | 0.12 | 0.16 | 0.75 |
| クロダイ 2 | 0.04 | 0.06 | 0.67 |
| チダイ | 0.11 | 0.16 | 0.69 |
| マダイ | 0.08 | 0.11 | 0.73 |

3 公定法に無い試験操作の検証

(1) 総水銀検量線作成溶液への試薬添加

結果を表 4 に示す。2 濃度共に、この操作を行ったものが、ピーク面積が広く変動も少なかった。このことより、この操作の有用性が確認された。

(2) 総水銀分析での最終試験溶液の持続性

結果を図 2 に示す。両試料共に 5 時間経過しても残存率の減少は約 2~3%であった。このことから、溶液の色を透明にした後に速やかに測定する必要性は低いと考えられるが、本検証は実試料を

表 4 水銀標準溶液のピーク面積 (n=3)

| 項目 | 操作 | 平均値 | CV (%) | 面積比 (操作無/有) |
|--------|-----|-------|--------|----------------|
| 1ng/ml | 操作無 | 15.57 | 2.4 | 0.94 |
| | 操作有 | 16.65 | 0.5 | |
| 5ng/ml | 操作無 | 82.16 | 1.7 | 0.98 |
| | 操作有 | 84.16 | 0.2 | |

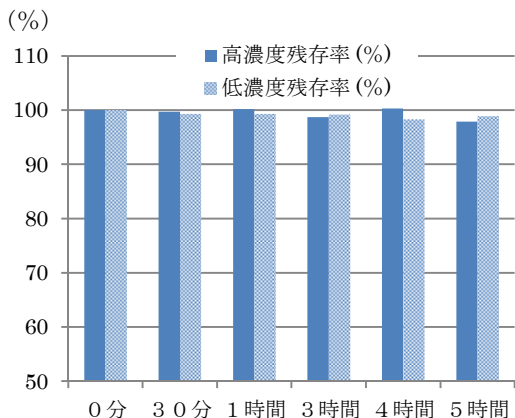


図 2 水銀残存率の経時変化

用いたものでないこと及び消色した時点で 20% 塩酸ヒドロキシルアミンの滴下を止め過剰に加えていないことを考慮すれば、本検証結果のみで本操作の有用性は判定できない。

塩酸ヒドロキシルアミンの還元性を考慮すれば、少なくとも溶液の色を透明にした時点で、分析の中断があってはならないと考えられるが、1 検体ごとに溶液の色を透明にし、定容の直後に水銀計で測定するまでの迅速性は必要ないと思われる。

4 添加回収試験等で判明した知見

(1) メチル水銀の分析法でエチル水銀の測定はできない

メチル水銀の添加回収試験に用いた標準溶液には、前述のとおり当量の塩化エチル水銀が含まれていたが、当試験においてエチル水銀が回収されなかったことから、このことが確認された。

メチル水銀分析の公定法と同様の手法で、低級アルキル水銀も分析可能との記載⁹⁾があるが、本法で、塩化エチル水銀は全く回収されなかった。標準溶液と添加回収試験試料のクロマトグラムを図 3 に示す。

アルキル水銀分析の回収率は良好なことより、システイン溶液を加えた後の水溶液段階では、水銀の何らかの形態で存在していると考えられる。よって、この水溶液を塩酸酸性下でベンゼン抽出

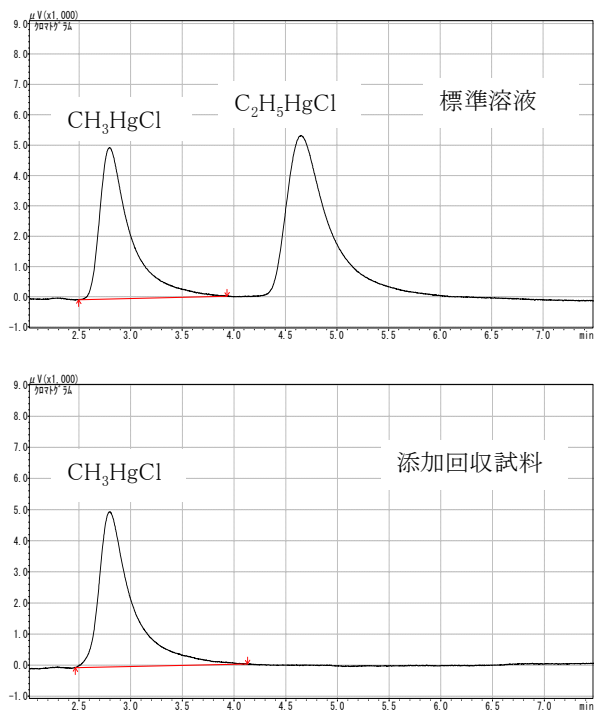


図 3 メチル水銀分析でのエチル水銀消失

する段階で、ベンゼン層に抽出されない形態となっていたか、あるいは抽出されても塩化エチル水銀とは異なる形態で存在していた可能性が考えられる。

(2) ベンゼン層中のメチル水銀は、中性の水で洗浄すると容易に水層へ移行する

メチル水銀分析の公定法と同様の手法で、最終試験溶液に少なからず残存する塩酸はアルキル水銀のピーク高さに影響する旨の記載⁹⁾がある。添加回収試験において、前処理が終了し、その最終試験溶液を翌日にガスクロマトグラフで測定した。この間に、残存する塩酸によりエチル水銀が分解あるいは形態が変化し、その結果エチル水銀のピークが消失した可能性が考えられる。

よって、最終試験溶液中の塩酸を除去するために、このベンゼン層を蒸留水で洗液が中性になるまで、5 回洗浄したところ塩化メチル水銀のピークまで消失した。ベンゼン中のメチル水銀が水層へ移行した可能性が考えられるが、ベンゼン中に存在する、脂溶性のメチル水銀⁹⁾が水層へ移行したとは考え難く、次の確認試験を行った。

50ml 分液漏斗に、システイン溶液 2ml, 6N 塩酸を 1.2ml, 0.05 μg/ml の塩化メチル水銀と塩化エチル水銀混合ベンゼン溶液 4ml を入れ、2 分間振とう後 10 分間静置した。水層を捨てただけのもの、

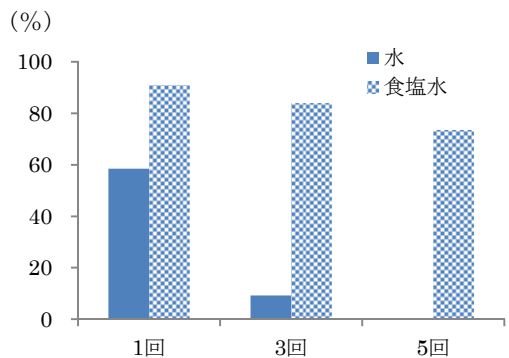


図4 洗浄回数によるメチル水銀残存率の変化

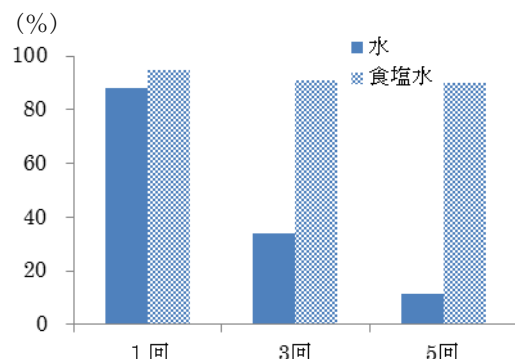


図5 洗浄回数によるエチル水銀残存率の変化

蒸留水 3ml で、1回、3回、5回洗浄したものを各々、無水硫酸ナトリウム 1g を加え脱水した後、ガスクロマトグラフで測定し、両物質の濃度から残存率を求めた。また、20%食塩水を洗浄水として用いての同様の試験も行った。

塩化メチル水銀の残存率を図4に、塩化エチル

水銀の残存率を図5に各々示す。また、この確認試験より得られたクロマトグラムを図6に示す。

塩化メチル水銀と塩化エチル水銀を比較すると、洗浄による残存率低下の程度から、塩化メチル水銀の方が塩化エチル水銀より、水層へ移行し易いことがわかった。

水へ移行することは、イオン状態に変化することを示している。メチル水銀分析において、試料からの抽出は塩酸性下で行うことは、魚介類の体内組織と結合しているメチル水銀を塩化物として遊離させるためである¹⁰⁾。また、イオン解離しているメチル水銀を強酸性下で非解離状態に変えベンゼン抽出可能とするものと解釈される。このことからすれば、水洗の繰り返しにより酸性から中性になれば、イオン状態になり水へ移行する可能性は考えられる。また、水への移行について記述した文献もある¹¹⁾。

しかし、1回の水洗時には、残存する塩酸の影響で強酸性の状態であるにもかかわらず、41.5%が水へ移行しており、抽出時の解釈では理解し難く、この現象をここに示した。

また、洗浄水が蒸留水と食塩水の場合を比較すると、食塩水の方が蒸留水より、残存率低下の程度は低く、塩析効果の重要性を再確認した。

最終試験溶液に洗浄の必要性が生じた場合は、食塩水で1回の洗浄にとどめるか、前述の文献⁹⁾にある、最終試験溶液を得たと同じ条件で酸処理したもので検量線を使用する必要がある。

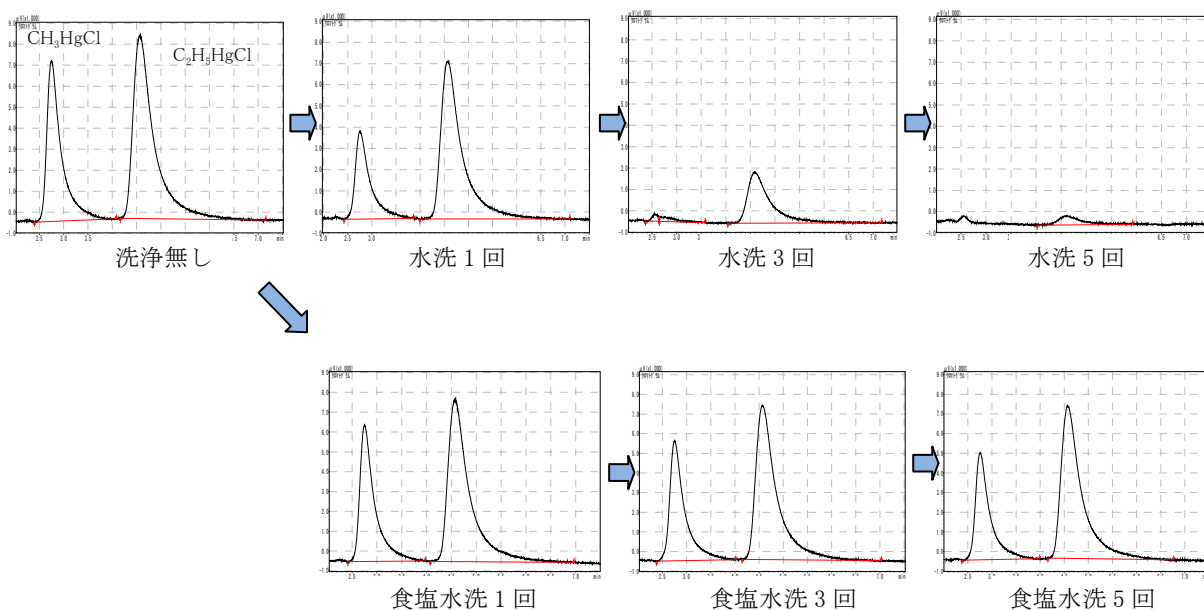


図6 洗浄によるアルキル水銀残存率の変化

文 献

- 1) 厚生省通知, 環乳第 99 号, 昭和 48 年 7 月 23 日
- 2) 日本食品衛生協会: 食品衛生検査指針 理化学編 2015, 557~561(2015)
- 3) 西村一彦 他: 抽出溶媒にベンゼン及びトルエンを用いない魚介類中のアルキル水銀分析法の検討, 分析化学, 61(10), 857~862(2012)
- 4) 林智子 他: 妥当性確認した分析法を用いた魚中メチル水銀濃度の実態調査, 第 51 回 全国衛生化学技術協議会年会 講演集, 118~119(2014)
- 5) 西村一彦 他: 水産加工食品中の総水銀・メチル水銀に関する実態調査, 道衛研所報, 62, 61~63(2012)
- 6) 日本薬学会: 衛生試験法・注解 2015, 414~415(2015)
- 7) 厚生労働省通知, 食安発第 0926001 号, 平成 20 年 9 月 26 日
- 8) 板野一臣, 海産魚介等に含まれる水銀とそのリスク評価, 生活衛生, 51, 57~65(2007)
- 9) 日本薬学会: 衛生試験法・注解 2015, 501~503(2015)
- 10) 日本分析化学会関東支部編: 公害分析指針 8 食品編 2-C, 52~60(1972)
- 11) 山縣登・大喜多敏一編: 環境汚染分析法 5, 73~79(1973)