

生体試料中のヒ素化合物のHPLC/ICP-MSによるスペシエーション

貝 瀬 利 一¹⁾, 櫻 井 照 明¹⁾, 山 田 政 行²⁾,
古 庄 義 明³⁾, 藤 原 祺 多 夫¹⁾

(¹⁾東京薬大・生命科学*, (²⁾セイコーインスツルメンツ**, (³⁾ジーエルサイエンス***)

【緒 言】

ヒ素は生態系を含む自然環境中において普遍的に分布しており、水圏生態系においてもさまざまな化学形態を取りながら存在している。しかしヒ素は生物に対して毒性が高いため、環境影響評価の観点からヒ素の生体影響について明らかにされねばならない。一般的にヒ素は主に飲料水や食品を介してヒトに侵入するが、特に海産生物に多量に含まれているため、多量のヒ素が海産食品を介してヒト体内に侵入することが考えられる。これまで海産物摂取によるヒ素中毒は報告されていないが、ヒ素による健康影響への懸念は残る。ヒ素のヒトに対する影響や生体内挙動は、ヒ素の化学形態に大きく依存することが考えられるため、ヒ素の化学形態別分析が必要であり、得られた結果について総合的に評価することが重要である。ヒ素の化学形態別分析法として、最近ではHPLCあるいはICによりヒ素化合物を分離した後、ICP-MSで検出する方法が多く用いられるようになってきた。しかし、これまで報告されている分析方法では分離に多くの時間を要し、アルゴンの消費量も多いため、ランニングコストが問題点となっていた。本研究ではHPLC/ICP-MS分析を行う際の省資源化を実現するために、逆相担体を充填したセミマイクロカラムを用いてヒ素化合物を分離し、ICP-MSで測定する高感度でかつ迅速な一斉分析法について検討し、淡水生物、海産生物ならびに海産物摂取後の尿中ヒ素の形態別定量を行ったので報告する。

【方 法】

標準ヒ素化合物としてFig. 1に示す亜ヒ酸ナトリウム (As^{3+}), ヒ酸ナトリウム (As^{5+}), メチルアルソン酸 (MAA),

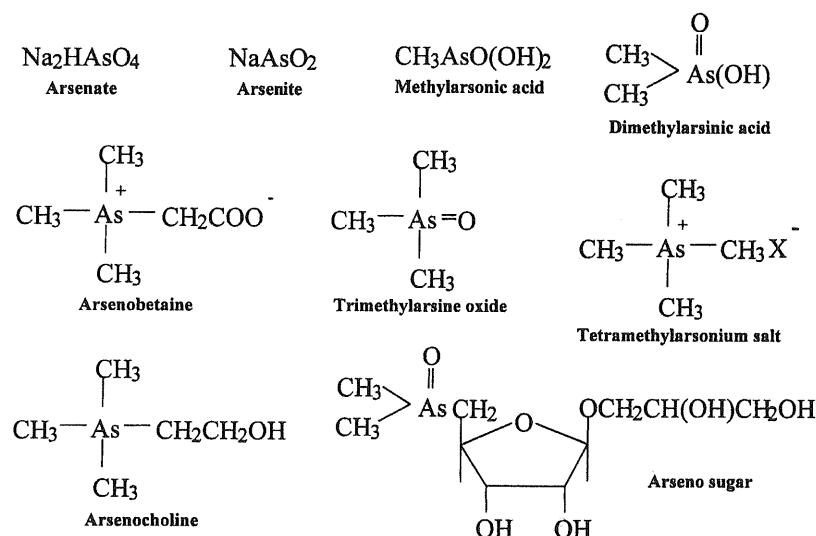


Fig. 1 標準ヒ素化合物の化学構造式

*所在地：東京都八王子市堀之内1432-1 (〒192-0392)

**所在地：千葉県美浜区中瀬1-8 (〒261-8507)

***所在地：埼玉県入間市狭山ヶ原237-2 (〒358-0032)

ジメチルアルシン酸 (DMAA), トリメチルアルシンオキシド (TMAO), アルセノベタイン (AB), アルセノコリン (AC), テトラメチルアルソニウム (TeM), アルセノシュガー (AS:2'R-dimethyl[1-O-(2',3'-dihydroxy propyl)-5-deoxy- β -D-ribofuranos-5-yl] arsine oxide) の9種類をトリケミカル研究所から購入した。

分離カラムは環境試料や生体試料の直接注入に対応できるように ODS系ガードカラムを装着した Inertsil AS (150mm $\times$ 2.1mm, 3.0 μ m) を用いてヒ素化合物の分離を行い, ICP-MSによりヒ素の検出を m/z75 でモニターした。溶離液は 10mM 1-ブタンスルホン酸ナトリウム, 4mM マロン酸, 4mM 水酸化テトラメチルアンモニウム, 0.05% メタノール, 希硝酸により pH3.0 に調製し, ヒ素化合物の分離条件の検討を行った。環境試料としてヒ素濃度の高い箱根早川河川水ならびにそこに生息する生物をサンプリングし, ヒ素化合物の定量を試みた。生物試料は 70% メタノールによりヒ素化合物を抽出してろ過を行った。さらに NIES ヒト尿標準物質ならびに海産物摂取後のヒト尿ヒ素の化学形態を把握するため, 尿はフィルターでろ過した後, 水で 6 倍に希釈した後, 一定量に同量の HPLC 移動相を加えてその 5 μ l を注入した。またヒト血液はアセトニトリルを加えて除タンパクを行って抽出した後, ろ過した。試料溶液は溶離液で適宜希釈し, 検量線からヒ素化合物の量を求めた。

【結果および考察】

従来用いられていたカチオンおよびアニオンイオン交換カラムを用いて IC を行う方法は 2 度の分析を必要とするのに対して, セミマイクロカラムを用いた方法により 9 種類のヒ素化合物について同時に一斉分析を行うことが可能となり, また少ないサンプル量 (5 μ l) での分析が可能で, 検出限界はそれぞれヒ素として 2.5pg であった。Fig. 2 にヒ素化合物 (10ppb) 溶液 5 μ l 注入して得られたクロマトグラムを示す。

9 種類のヒ素化合物の相互分離は良好であり, 分析時間も 6 分と大幅に短縮できた。箱根早川河川水について検討したところ, 主要ヒ素化合物はヒ酸であり, 微量ヒ素化合物として亜ヒ酸, メチルアルソン酸, ジメチルアルシン酸, トリメチルアルシンオキシドなどが確認された。このことから温泉に由来する無機ヒ素が微生物などの生物作用により有機ヒ素化合物に変換されたり, 無機ヒ素が生物体内に取り込まれてメチル化を受けた後, 河川水中に排泄されることが

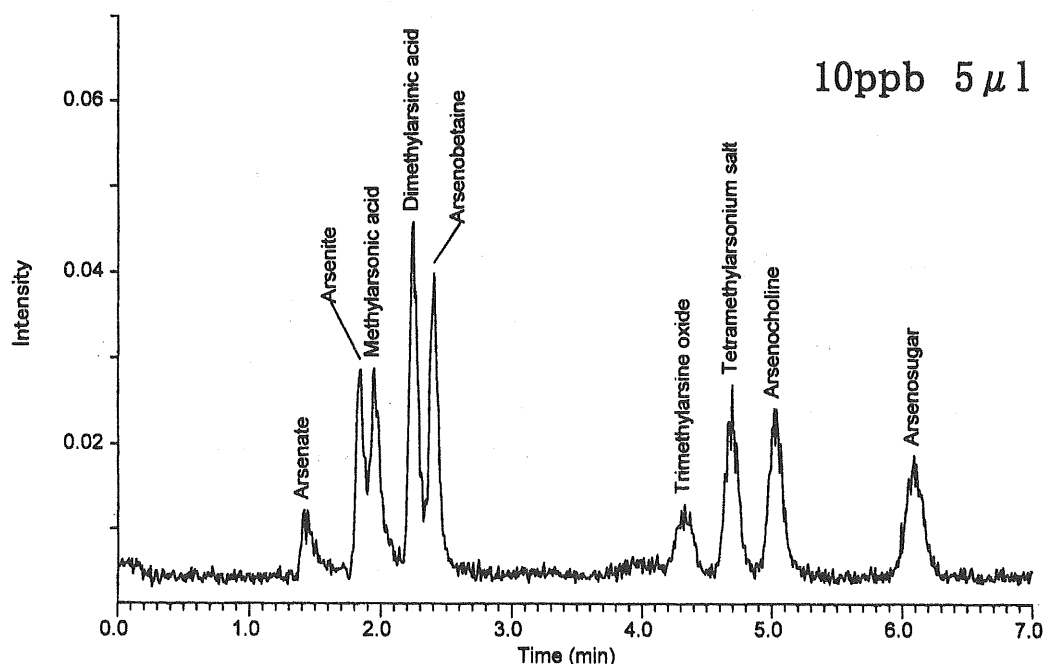


Fig. 2 標準ヒ素化合物の HPLC/ICP-MS クロマトグラム

考えられた。また藻類ならびに海藻からはASならびに未知のヒ素化合物と思われるピークが検出された (Fig. 3)。

さらに昆虫の幼虫であるヒゲナガカワトビケラから藻類と類似したヒ素溶出パターンが得られた。しかし、肉食性甲殻類のカニからはABが検出され (Fig. 4)、河川生態系でも海洋生態系と同様のヒ素の循環が行われていることが明か

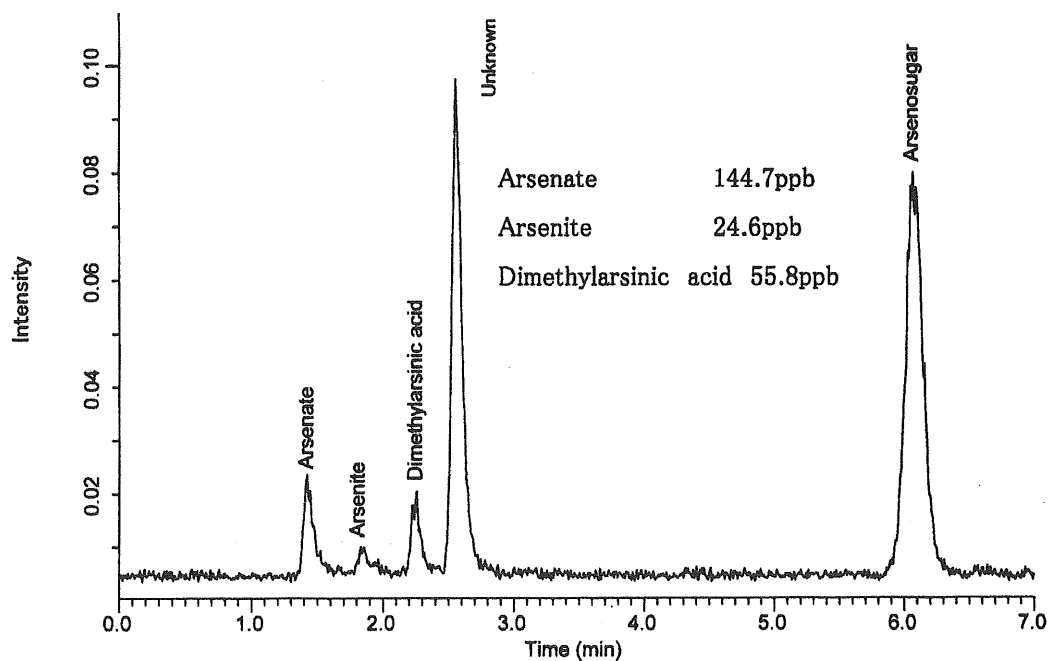


Fig. 3 淡水産藻類中のヒ素化合物のHPLC/ICP-MSクロマトグラム

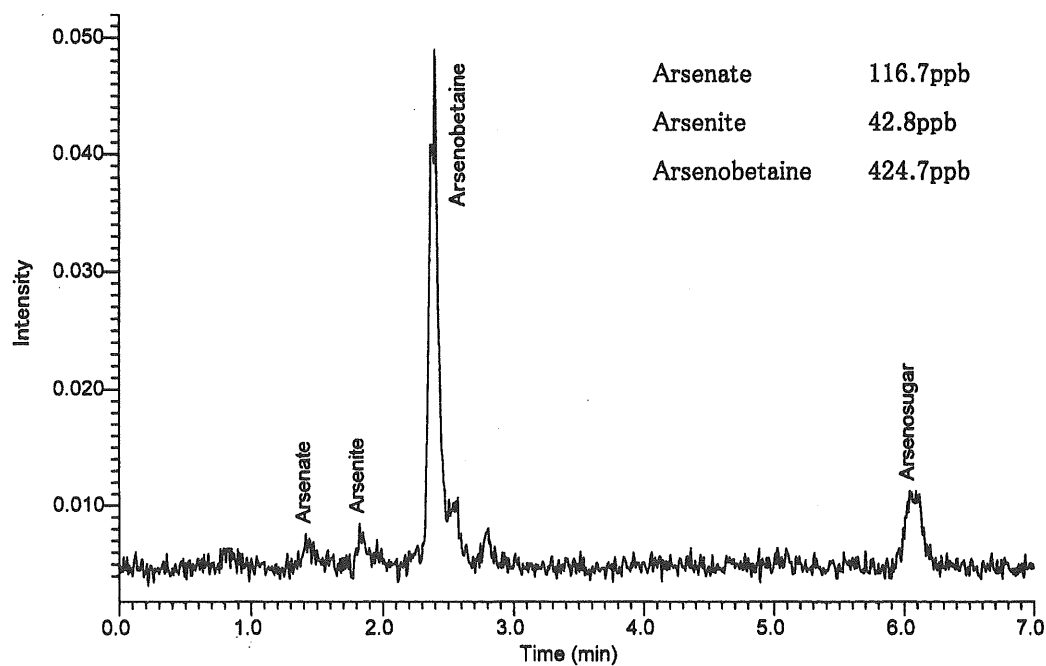


Fig. 4 淡水産カニ筋肉中のヒ素化合物のHPLC/ICP-MSクロマトグラム

となった。

またヒト尿試料について検討したところ、DMAAならびにABが検出され、摂取した海産物に由来するものと考えられた。NIES CRM No.18 ヒト標準尿ならびに健康人の尿を6倍希釈して測定したところ、DMAAならびにアルセノベタインが尿中に主ヒ素化合物として検出され、摂取した海産物に由来すると考えられた。NIES CRM No.18 ヒト標準尿ではジメチルアルシン酸が37.6ng/mL, アルセノベタインが69.0ng/mL 検出され、それぞれの保証値 36 ± 9 ng/mL, 69 ± 12 ng/mL によく一致し、再現性、精度共にすぐれた方法であることが明かとなった (Fig. 5)。

また魚類摂取後の尿中からはアルセノベタインが検出され、ヒト体内でほとんど代謝を受けずに排泄されることが明かとなった。以上の結果から、セミマイクロカラムを用いたICP-MS分析により、分析時間の短縮化、アルゴンガスや緩衝液の省資源化、低コスト化が達成され、環境試料、生体試料など多検体の迅速スクリーニング法としての有用性が期待された。

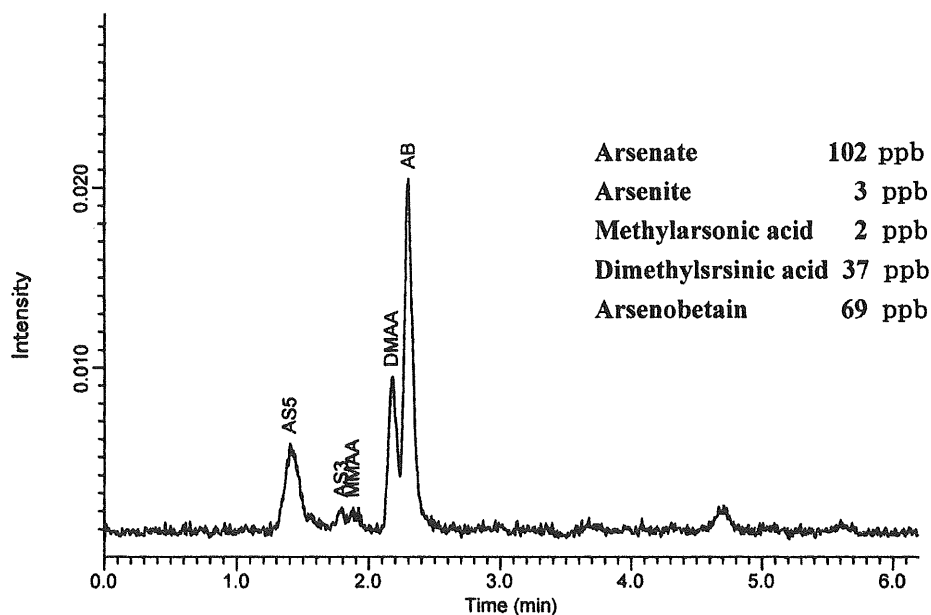


Fig. 5 ヒト標準尿中 (NIES CRM No.18) のヒ素化合物のHPLC/ICP-MSクロマトグラム