

令和元年6月21日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15374

研究課題名(和文)尿中水銀化合物の誘導体化抽出による一斉形態別分析法の開発

研究課題名(英文)Directly derivative extraction of mercury in human urine for the speciation analysis by GC/MS

研究代表者

長尾 正崇 (Nagao, Masataka)

広島大学・医系科学研究科(医)・教授

研究者番号：80227991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)による、尿中水銀化合物の同定・定量分析に至るまでのハイスループット分析法の開発おこなった。その結果、1)テトラエチルほう酸ナトリウム及びテトラフェニルほう酸ナトリウムを誘導体化剤とすることで、尿中の無機水銀と有機水銀を分離分析する系統的化学形態別抽出が可能となった。尿中水銀類濃度を2.5、25、250ng/mlとした場合の日内間のはらつきは0.97～2.75%と良好な再現性が確認できた。ただし、MonoSpinC18での抽出を検討した結果、液液抽出に比べて回収率の面で問題のあることが判明し、今後の課題として残された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでは無機水銀と有機水銀を別々の操作・機器で検出していたが、本法を使用することでGC/MSという一つの機器でかつ簡便な抽出法で化学形態別(無機水銀とメチル水銀)の分析が可能となった。本手法は、他施設での検証でも施設間誤差の少ない方法であることが確認され、今後の産業労働衛生に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Our purpose in this study is to develop the high-throughput analysis methods for identification and quantitative analysis of mercury compounds (Hg) remained the chemical speciation in urine by gas chromatograph / mass spectrometer (GC / MS). Since derivatization is necessary to analyze Hg in urine by GC / MS, ethylation and phenylation were examined by using sodium tetraethyl borate and sodium tetraphenyl borate. After adding 0.5 ml of buffer solution to urine, the derivatizing agent was added and extracted with 1-chlorobutane for analysis. Good linearity was confirmed in the range of 1 to 250 ng / ml of Hg concentration in urine, and the detection limit was 1 ng / ml. The inter-day variability for the urine spiked with 2.5, 25, 250 ng / ml of urinary inorganic Hg and MeHg was 0.97-2.75%. It is expected that the method developed in this research will have similar results in other laboratories, and it will be expected to contribute to industrial occupational health in the future.

研究分野：中毒学

キーワード：産業衛生 中毒 分析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

水銀は、古代より延命や美容に有効であるとの迷信があり世界中の権威者が用いていた。また、杉田玄白も水銀化合物を梅毒の治療に用いたとの記載があるが、その当時から多くの水銀中毒を発症していたようである。特に、1930年代よりメチル水銀の蓄積した魚を食べ、未曾有の水銀中毒が発生したこと(水俣病)は記憶に新しい。水銀化合物は、現代でも種々の産業に用いられ不可欠な物質であるが、開発途上国では汚染が大きな社会問題となっている。

近年、労働安全衛生規則の改正(平成27年6月23日)や化学物質等による危険性又は有害性等の調査等に関する指針の公示(平成27年9月18日)において、水銀をはじめとする化学物質のリスクアセスメントが義務づけられるが、簡便、正確で安価な化学形態別分析法が無いために、化学形態による毒性評価もままならない状況である。現在、総水銀量とメチル水銀量の分析は、用途に応じて各々専用の機器を用いて日常的に行われているが、一つの汎用機器を使った再現性の高い化学形態別の一斉分析法の確立が喫緊の課題とされている。

これまでは、「総水銀量は水銀メーター、メチル水銀量はカスクロマトグラフ/電子捕獲型検出器(GC/ECD)」での検査との固定観念により、一つの機器での形態別分析の詳細な検討すらなされていないのが現状である。近年の分析機器の発達により、高速液体クロマトグラフ-誘導結合プラズマ/質量分析計(HPLC-ICP/MS)を用いることによって化学形態別分析は可能となったが、高価な機器が故に汎用性を欠く。また、高価なアルゴンガスを大量に消費するために、日常分析には不向きとなっている。

### 2. 研究の目的

本研究では、図1に示すように水銀化合物(無機水銀と有機水銀)を尿中で直接誘導体化した後に分離・精製し、濃縮操作を行わずに汎用機器となっているGC/MSで分析する新規の系統的分析法の確立を行う。さらに、微量採取試料からの分析にも対応した施設間誤差の少ない方法であることを検証する。

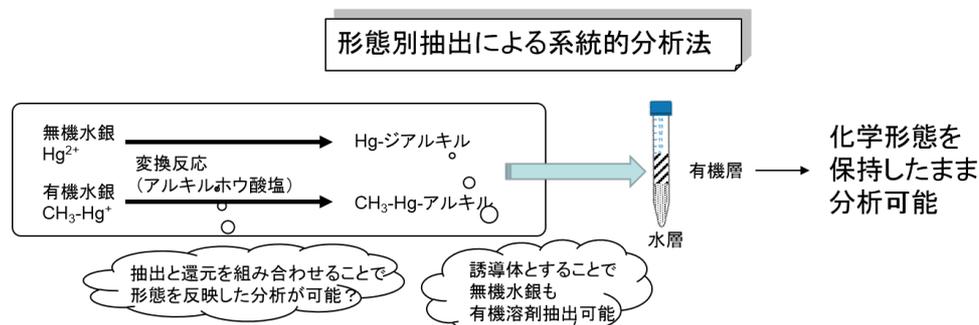


図1. 本研究の概要

### 3. 研究の方法

(1) 化学形態保持に優れた誘導体化剤の選択、(2) 内部標準物質の検討、(3) 溶剤による抽出条件の検討、(4) スケールダウンの検討、(5) MonoSpinによる抽出条件の検討、(6) 生体試料中水銀分析のバリデーションデータの収集を行う。さらに、研究協力者である香川大学医学部衛生学(協力研究員)(兼 中央労働災害防止協会)の竹内靖人氏らと共同で、施設間誤差および実用性の評価を検討する。対象とするモデル化合物は、尿中排泄濃度の高い無機水銀とメチル水銀、エチル水銀とする。

分析条件は、以下の通りである。

GCMS	: 6890 GC / 5973 MSD (Agilent Technologies)
カラム	: DB-1MS (30m, 0.25mm, 0.25 $\mu$ m film thickness)
昇温条件	: 40 (6min), 40-280 (30 /min, linear), 280 (3min hold)
キャリアーガス	: He (1.0ml/min, constant flow)
注入口温度	: 250
検出質量	: SCAN ( $m/z$ 50-450)
	: SIM; Ethyl derivatives, $m/z$ 246 (MeHg <sup>+</sup> ), 260 (Hg <sup>2+</sup> ), 274 (PrHg <sup>+</sup> , IS)
	: Propyl derivatives, $m/z$ 294 (MeHg <sup>+</sup> ), 308 (EtHg <sup>+</sup> ), 322 (PrHg <sup>+</sup> , IS), 356 (Hg <sup>2+</sup> )

### 4. 研究成果

#### (1) 化学形態保持に優れた誘導体化剤の選択

ジメチル水銀やジエチル水銀などのジアルキル水銀化合物は揮発性があるために、溶剤で抽出した後にGCでの分析が可能である。しかし、尿などに存在する水銀は、 $Hg^{2+}$ 、 $CH_3-Hg^+$ 、 $CH_3CH_2-Hg^+$ の形態で存在するためにGCでの分析の前には誘導体化する必要があり、アルカリほう酸塩で誘導体化す小手法が良く知られている。入手可能なアルカリほう酸塩としては、テトラエチルほ

う酸ナトリウム (NaEt<sub>4</sub>)、テトラプロピルほう酸ナトリウム (NaPr<sub>4</sub>)、テトラフェニルほう酸ナトリウム (NaBPh<sub>4</sub>) の 3 種類がある。それぞれの特徴として、NaEt<sub>4</sub> は安価であるが水分に敏感で空気中の水分で発火する危険性がある。NaPr<sub>4</sub> は高価であり水分に敏感である。NaBPh<sub>4</sub> は安価であるが、フェニル化を用いる方法は、方法の単純さ、頑強性および安全性の点から満足のものではなかったとの報告がある。

これら既存の報告を参考に、本研究に使用可能な誘導体化剤について詳細に検討した。その結果、NaPr<sub>4</sub> では誘導体化物は検出できず、NaEt<sub>4</sub> と NaBPh<sub>4</sub> で誘導体化物が検出された。NaEt<sub>4</sub> を用いた場合には無機水銀 (Hg<sup>2+</sup>) とメチル水銀 (MeHg<sup>+</sup>) が、NaBPh<sub>4</sub> を用いた場合には無機水銀 (Hg<sup>2+</sup>) とメチル水銀 (MeHg<sup>+</sup>)、エチル水銀 (EtHg<sup>+</sup>) が化学形態を保持したままで区別する (クロマトグラム上で分離できる) ことが可能であった (図 2)。両者ともに利点および欠点が指摘されているが、結果に関しては甲乙付け難いので、以後の実験では、両誘導体化剤ともに検討を加えることとした。

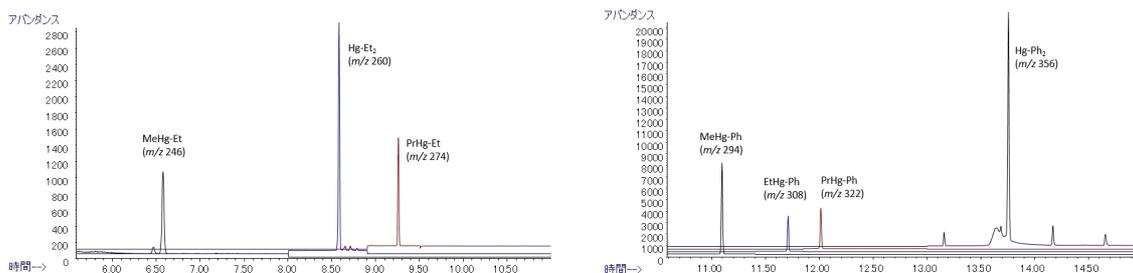


図 2. 各種水銀化合物をテトラエチルほう酸ナトリウムおよびテトラフェニルほう酸ナトリウムで誘導体化して得られたクロマトグラム

### ( 1 - 1 ) 誘導体化条件の検討

アルカリほう酸塩での誘導体化では、至適 pH の狭いことが指摘されている。これを検証する目的で、緩衝液の pH を 3.5 ~ 5.5 に変更して誘導体化の効率を検証した。誘導体化の効率は、GC 分析して得られたクロマトグラムのピークの面積値で判断した。その結果を図 3 に示したが、本研究で検討した範囲内では、明らかな誘導体化効率に差が認められなかった。

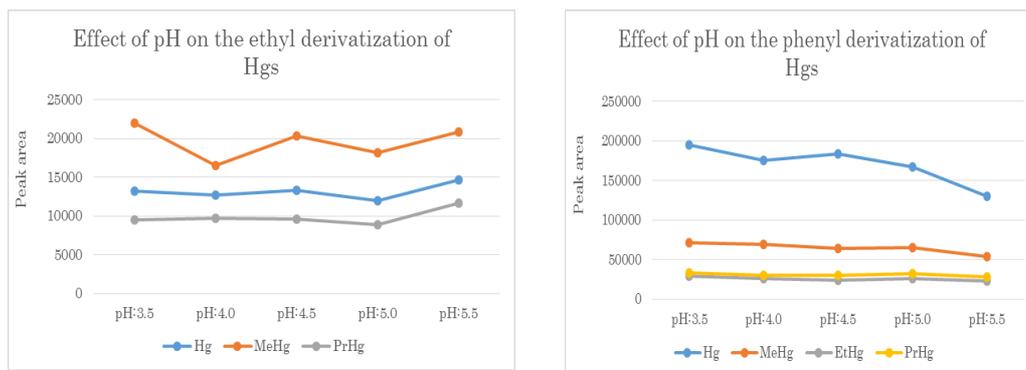


図 2 . 各種 pH による水銀化合物の誘導体化効率

### ( 1 - 2 ) 添加する誘導体化剤の量

誘導体化時に添加する誘導体化剤の量についても検討した。誘導体化剤の濃度は 1% (w/v) とした。濃度依存的に誘導体化物の生成量が増加したが、添加量は試料量 0.5ml に対して 40 $\mu$ l を越えたところで生成量の増加が見られなくなったことから、添加量は 40 $\mu$ l とした。

### ( 1 - 3 ) 尿中妨害成分の誘導体化への影響

尿中妨害成分が、誘導体へ悪影響を及ぼすか否かを検証した。緩衝液 0.5ml に尿を 0.1 ~ 0.5ml の範囲で混和し、NaEt<sub>4</sub> および NaBPh<sub>4</sub> を添加して誘導体の生成量を比較した。その結果、図 4 に示すように NaEt<sub>4</sub> では使用する尿量に関わらずに一定の誘導体化物が検出されたが、NaBPh<sub>4</sub> では使用する尿量が多くなるにしたがって誘導体化物の生成が抑制される結果となった。

誘導体化は脂質などの有機物質によって妨害されていると想定し、これらを吸着・除去する目的で、限外濾過膜 (3kDa, 10kDa, 30kDa) や疎水性固相カラム (Waters, HLB, 1cc) を通液させて誘導体化を試みたが、改善することは出来なかった。最終的に妨害成分は特定できず、今後の検討課題として残された。

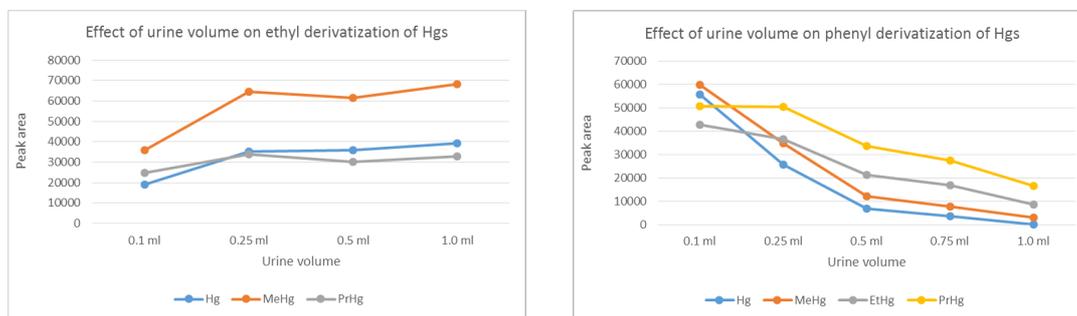
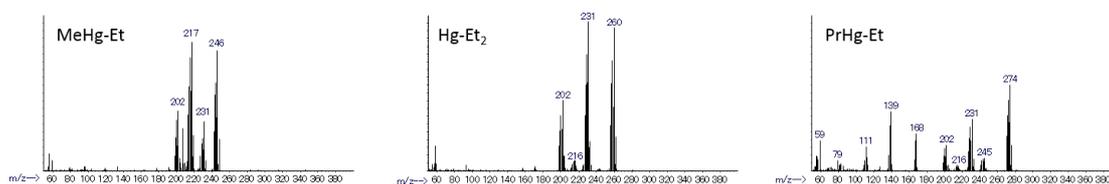


図4. 各種水銀化合物の誘導体化に及ぼす尿量の影響

## (2) 内部標準物質の検討

GCMSでの分析では、通常、水素原子などが重水素(安定同位体)などで置換された標識化合物を内部標準物質として使用する。しかし、水銀自体が複数の同位体を持つ( $^{196}\text{Hg}$ ,  $^{198}\text{Hg}$ ,  $^{199}\text{Hg}$ ,  $^{200}\text{Hg}$ ,  $^{201}\text{Hg}$ ,  $^{202}\text{Hg}$ ,  $^{204}\text{Hg}$ の7種が、0.15%, 9.97%, 16.87%, 23.1%, 13.18%, 29.86%, 6.87%の比率で存在する)ために、数Daの間に複数のスペクトルが検出される(図5)。それ故、これまでに行われていた安定同位体を用いて数Daと言った $m/z$ の違い(マスペクトルのフラグメンテーションで検出される特徴的なイオンを使用した安定同位体で置換された標識化合物との区別)が困難となり、内部標準物質として使用することはできなかった。また、アルキル水銀の重水素置換体も入手不可能であった。そこで、生体内には存在しないアルキル水銀化合物であるプロピル水銀を内部標準物質の候補とした。図5に各種水銀化合物を $\text{NaEt}_4$ および $\text{NaPh}_4$ で誘導体化して得られたマスペクトルを示したが、プロピル水銀は他の検出目的物(無機水銀やメチル水銀など)と重複せず、図2に示したようにクロマトグラム上も分離できることから、内部標準物質として適していると判断した。

### Ethyl derivatives



### Phenyl derivatives

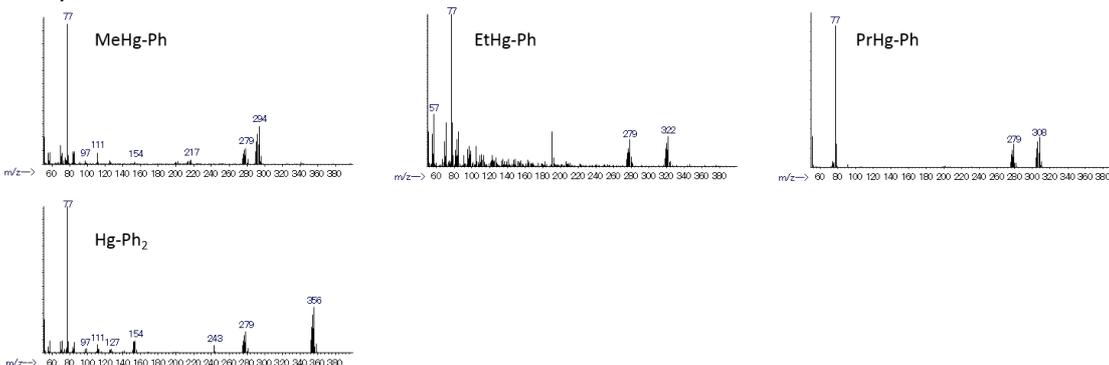


図5. 各種水銀化合物をテトラエチルほう酸ナトリウムおよびテトラフェニルほう酸ナトリウムで誘導体化して得られたマスペクトル

## (3) 溶剤による抽出条件の検討

既存の方法では、抽出溶媒としてトルエンが汎用されている。抽出溶媒の検討の結果、トルエンが選択されていると考えられるが、検討結果の詳細が見当たらなかったため、溶媒の種類の違いによる検出目的物の抽出効率の差や内因性妨害物質の共抽出の度合いを検証した。検討には抽出後の有機層採取の操作性を考慮して(水と混和せずに水よりも比重の軽い)ヘキサン、酢酸エチル、1-クロロブタン、*tert*-ブチルメチルエーテル、トルエンを使用した。検討の結果、1-クロロブタンを抽出溶媒として用いた場合で綺麗に2層に分離し、得られたクロマトグラムでも妨害物質のピークが少なかったため、以降の検討では1-クロロブタンを使用することとした。

#### (4) 抽出系スケールダウンの検討

既存の報告では尿を 5~10ml 使用して分析に供している。使用する器具の大きさや操作の煩雑さが懸念される。これを解消する目的でマイクロチューブなどディスプレイ品に置き換えることが出来ないかを念頭に、抽出スケールのダウンサイズ化を検討した。先の(1-3)尿中妨害成分の誘導体化への影響とも関連するが、最大 2ml サイズのマイクロチューブ使用を目的にして使用する尿量を検討した結果、誘導体化剤に NaEt<sub>4</sub> を用いる場合には尿量を 0.5ml、NaBPh<sub>4</sub> を用いる場合には尿量を 0.1ml とすることとした。

#### (5) MonoSpin による抽出条件の検討

スケールダウンした結果を踏まえ、MonoSpin での抽出を検討した(図6)。緩衝液 0.5ml に NaEt<sub>4</sub> を用いる場合には尿量を 0.5ml、NaBPh<sub>4</sub> を用いる場合には尿量を 0.1ml 添加し、それぞれの誘導体化剤 40μl を添加して攪拌する。事前にメタノール 0.3ml および水 0.3ml で活性化・洗浄した MonoSpin C18 に反応液をアプライして遠心・通液し、検出目的物の誘導体をカラムに保持させる。水 0.3ml で洗浄した後に 1-クロロブタン 0.1ml で溶出し、GC/MS で分析する。

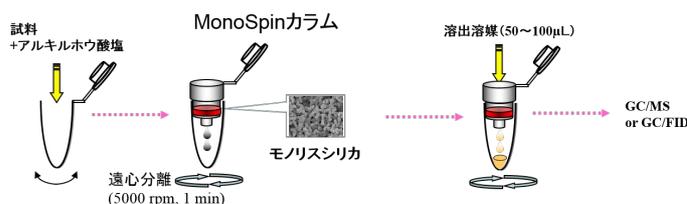


図6. MonoSpin を使用した抽出法の手順

その結果のクロマトグラムを図7と8に示したが、NaEt<sub>4</sub>を用いた場合には HgEt<sub>2</sub> と MeHgEt、NaBPh<sub>4</sub>を用いた場合には HgPh<sub>2</sub> と MeHgPh、EtHgPh が抽出・検出された。それぞれの回収率は、Et 誘導体で 40%程度であったが、Ph 誘導体では Hg (50%)、MeHg (30%)、EtHg (20%)、PrHg (数%) とアルキル鎖に依存して悪くなる傾向が見られた。

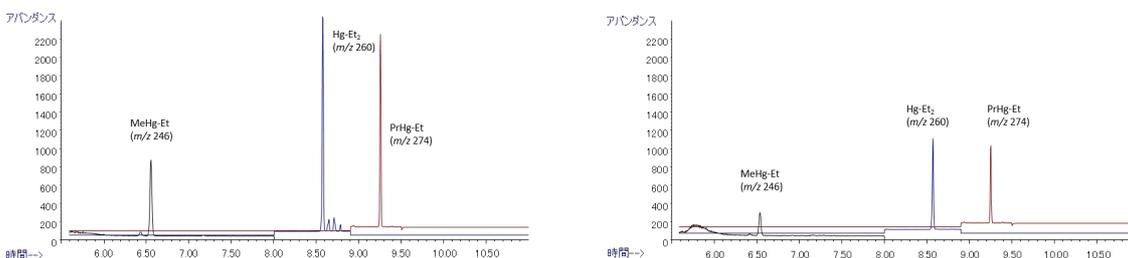


図7. 尿中水銀化合物を NaEt<sub>4</sub> で誘導体化後に MonoSpin C18 で抽出して得られたクロマトグラム

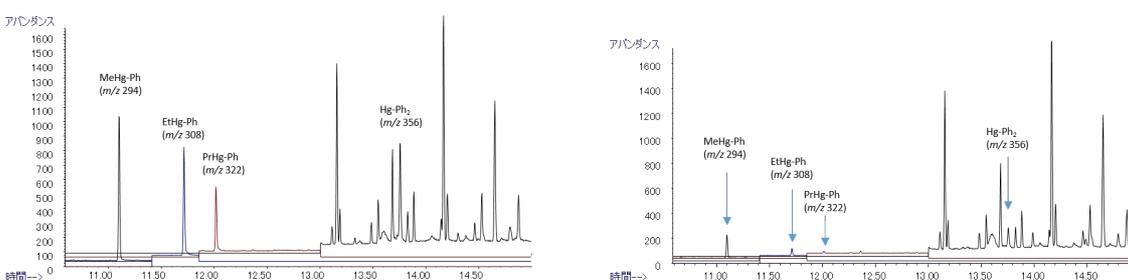


図8. 尿中水銀化合物を NaBPh<sub>4</sub> で誘導体化後に MonoSpin C18 で抽出して得られたクロマトグラム

#### (6) 生体試料中水銀分析のバリデーションデータの収集

NaEt<sub>4</sub> を用いた場合では、1.0~250ng/ml の範囲で良好な直線性が得られ、検出下限は 0.2~0.5ng/ml であった。NaBPh<sub>4</sub> を用いた場合では、10~250ng/ml の範囲で良好な直線性が得られ、検出下限は 2~5ng/ml であった。いずれの誘導体化剤を用いた場合でも、許容勧告の 35μg/g (クレアチニン補正) を検出することは可能であった。尿中無機水銀およびメチル水銀の濃度を 2.5、25、250ng/ml には尿量を 0.5ml、NaBPh<sub>4</sub> を用いる場合には尿量を 0.1ml とすることとした。いずれの手法でも、0.97~2.75% のばらつきとなり、再現性も確認できた。

以上より、これまでは無機水銀と有機水銀を別々の操作・機器で検出していたが、本法を使用することで GC/MS という一つの機器でかつ簡便な抽出法で化学形態別(無機水銀とメチル水銀)の分析が可能となった。本手法は、他施設での検証でも施設間誤差の少ない方法であることが確認され、今後の産業労働衛生に寄与することが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：奈女良 昭

ローマ字氏名：NAMERA, akira

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科（医）

職名：准教授

研究者番号（8桁）：30284186

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：竹内 靖人

ローマ字氏名：(TAKEUCHI, akito)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。