

米のヒ素分析－形態別分析と簡易分析－

国立研究開発法人農業環境技術研究所 有機化学物質研究領域 馬場浩司

1. はじめに

米中ヒ素の規制はコーデックス委員会での決定のように無機ヒ素に対してのものであり、米中無機ヒ素を分析するためには米に含まれる有機ヒ素との分離、定量が必須となる。このため、総ヒ素分析よりも一段高度な技術を要する。近年、その分析法についても進展があり、本発表ではよく用いられている分析方法を中心に説明するとともに、農業環境技術研究所での分析事例についても実際に直面した問題点なども含めて紹介する。米中無機ヒ素の分析は、現在、高額な機器を用いた分析方法しか無く、恵まれたラボを除き分析を実施することが困難である。数は少ないものの米中ヒ素の化学形態別分析が可能な受託分析会社も利用できるが、一例で言うと検体当たり 15,000 円と相当な費用がかかる。本発表の最後には、これらの問題を解決するため、現在農水省の委託プロで実施している米中無機ヒ素の簡易分析法の開発についても紹介する。

2. 米中のヒ素

分析をおこなうに当たっては、その対象について十分に知っておく必要がある。ここでは分析方法の説明の前に、米の中のヒ素とは何なのかを再確認する。なお、土、水からどのように米にヒ素が移行するのかについては他の発表者の説明を参考にされたい。農林水産省の 600 点に及ぶ平成 24 年産米実態調査¹では、玄米の総ヒ素中央値 0.21 mg/kg、無機ヒ素中央値 0.20 mg/kg、精米の総ヒ素中央値 0.13 mg/kg、無機ヒ素中央値 0.12 mg/kg ではあった。玄米における無機ヒ素の割合は 92%、精米では 90%、玄米と精米の比較では総ヒ素では玄米の 63%、無機ヒ素で 60%であった。平成 16-18 年産米実態調査ではやや低く、玄米の総ヒ素中央値 0.16 mg/kg、無機ヒ素中央値 0.15 mg/kg であった。これらの値は過去の国内産米中ヒ素の文献値とも矛盾しない。精米にすることで 6 割程度にヒ素濃度が減少するのはヒ素が精米により失われる部分であるぬか層あるいは胚芽でより高濃度であることを示している。また、精米による無機ヒ素減少比率は総ヒ素より有意に高いことから、ぬか層あるいは胚芽部分で無機ヒ素の割合は高いと言える。無機ヒ素にはヒ素の価数が 3 の亜ヒ酸と価数が 5 のヒ酸があり、有機ヒ素にはジメチルアルシン酸 (DMA) が主であるが、モノメチルアルソン酸 (MAA) が検出される場合もある (図 1)。

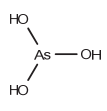
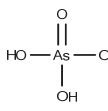
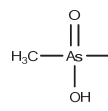
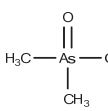
				
	亜ヒ酸	ヒ酸	モノメチルアルソン酸	ジメチルアルシン酸
分子量	125.94	141.94	139.97	138
水溶解度 (g/L)	20.5	590	256	667
酸解離定数	9.2、13.5	2.34、6.9、11.4	3.6、8.2	6.3

図 1. 米中に含まれるヒ素化合物

海外の文献ではアルセノベタイン²やテトラメチルアルソニウム³が報告されているが、極めて少数例であり、その真偽も含めて特殊なケースと考えてよい。無機ヒ素を亜ヒ酸、ヒ酸と分別定量した文献では国産米中無機ヒ素の大部分は亜ヒ酸であるとしている。例えば産総研で認証標準物質として頒布されていた白米標準粉末 7503a (表 1) では、無機ヒ素の 8 割以上が亜ヒ酸である。表 1 から分かるように亜ヒ酸、ヒ酸と分けずに無機ヒ素として認証値を与えていることが多く、7503a が販売終了となった今は亜ヒ酸、ヒ酸それぞれの認証値を与えている認証物質は国内外にも無い。

表 1. 国内で作成されたヒ素の化学形態別認証値の付与された米認証物質

	亜ヒ酸	ヒ酸	ジメチルアルシン酸
NMIJ 7502a (白米)	0.098 ± 0.006 (無機ヒ素として)		0.0129 ± 0.0010
NMIJ 7503a* (白米)	0.0711 ± 0.0029	0.0130 ± 0.0009	0.0133 ± 0.0009
NMIJ 7532a (玄米)	0.289 ± 0.008 (無機ヒ素として)		0.0186 ± 0.0008

*NMIJ 7503aは販売終了

このことは、後段述べるように米中の亜ヒ酸とヒ酸を分別定量することが難しいことが一因である。これらのヒ素化合物の米一粒中の分布については、アメリカ産米ではあるが放射光を利用した固体直接分析についての報告がある⁴ (表 2)。固体を直接分析することで抽出時に起こりえる化学形態変化の影響を排除している。ここで As(Glu)₃ (Glu はグルタチオンの略) とされているが、As(Glu)₃ そのものが含まれているのではなく、As に対する結合様式が As(Glu)₃ と類似し As とチオールとの As-S 結合を持つような化合物、例えばフィトケラチン結合体などが想定されている。

As(Glu)₃ の As は 3 価であり、米抽出時には加水分解されて亜ヒ酸へと変化することも考えられるので、通常おこなわれる酸抽出後の機器分析では亜ヒ酸が主要化学形態であることと矛盾しない。

表 2. 米の各部位でのヒ素の化学形態の割合 (%)

	ジメチル アルシン酸	モノメチル アルソナス酸*	As(Glu) ₃ **	亜ヒ酸	ヒ酸
胚乳	27.2	—	55.6	18.4	1.5
ぬか	26.1	—	52.9	12.9	13.3
もみ殻	15.8	30.6	12.9	20.3	20.3

*: モノメチルアルソン酸のオキソ配位子が解離し3価のヒ素となったもの。

**Glu: glutathione

3. 化学形態別分析

米中ヒ素の化学形態別分析には約 20 年の歴史があり、亜ヒ酸とヒ酸を還元気化によりアルシニングガスとし原子吸光分析により定量する方法 (HG-AAS) やイオンクロマトにより分離し ICPMS で定量する方法 (IC または HPLC-ICPMS) を中心に種々の方法が報告されている。現在では、感度や汎用性の高さ、装置の技術的進歩、低価格化などから HPLC-ICPMS を利用する報告例が多い。しかし、なお 2,000 万円近い装置価格やアルゴンガス消費量が多くランニングコストが高い点から HG-AAS が好まれる例も多い。では実際に利用されている分析法はどうであろうか。同じ米試料を大学、公的研究機関、民間分析機関問わずアメリカを中心 (北アメリカ 64%、ヨーロッパ 21%、その他 15%) に 39 の分析機関で分析法に制限を付

けずに分析した報告⁵があり、その一部を表3、表4にまとめた。

表3. 各試験室のヒ素の化学形態別分析条件

抽出法	試験室数	分離方法	試験室数	検出法	試験室数	ICPMSメーカー	試験室数
硝酸抽出	26	HPLC	37	ICP-MS	37	Agilent	25
その他	6	その他	3	HG-AAS	2	Perkin Elmer	10
水抽出	3	HG-CT-GC	1	HG-AFS	1	Thermo	3
塩酸抽出	3			HG-ICP-MS	1	その他	3
メタノール抽出	2						
トリフルオロ酢酸抽出	1						

表4. 米のヒ素化合物分析の室間比較

		精米無機ヒ素	玄米無機ヒ素	精米DMA	玄米DMA	精米総ヒ素	玄米総ヒ素
中央値(μg/kg)		30.15	38.9	8.49	7.71	40.7	52.46
正規化四分位範囲		7.40	7.16	4.52	4.55	5.93	4.96
評価	Z*			試験室数			
4(Excellent)	0.00-0.50	12	12	11	13	13	12
3(Good)	0.50-1.00	8	7	6	3	10	8
2(Marginal)	1.00-1.50	5	5	3	5	3	3
1(Poor)	1.50-2.00	2	3	0	1	2	3
0(Unacceptable)	>2.00	4	4	4	3	5	8
検出限界未満		2	3	9	9	3	3
測定せず		8	7	8	7	5	4

*四分位数法によるZスコア：Z=|(各試験所での分析値-中央値)|/(正規化四分位範囲)

表3で示された使用分析条件からは、アメリカ中心の参加機関ではあるが、硝酸抽出しHPLC-ICPMSで分析することが趨勢になっていると言える。分析結果の室間比較(表4)からは許容できないレベル(Z値が2を超えるもの)は無機ヒ素で全報告数の10%程度であるが、報告された中には検出限界未満や未測定も多く、それらを考慮すると許容できる結果を報告したのは全報告数の67%程度である。総ヒ素については、未測定数は減ったもののその分Z>2の試験室数が増えている。依然としてヒ素が難しい分析対象の1つであることを示している。濃度が無機ヒ素より低いDMAにおいては検出限界未満となった試験室が測定した試験室の25%を超えさらに分析は困難となっている。

近年、今後のヒ素規制を踏まえ分析法の信頼性を担保するためヒ素の化学形態別分析法について室間試験がおこなわれるようになってきた。欧州共同体の標準物質・計測研究所(IRMM)でおこなわれたフローインジェクション(FI)-HG-AASによる食品中無機ヒ素分析の室間試験結果⁶の概要(米の部分のみ抜粋)を表5に示す。

表5. IRMMで実施した食品中無機ヒ素のFI-HG-AAS分析の室間試験(米の結果のみ抜粋)

有効試験所数	外れ値検定で除外された試験室数	平均値(mg/kg)	併行標準偏差(mg/kg)	併行相対標準偏差(%)	室間再現標準偏差(mg/kg)	室間再現相対標準偏差(%)	HorRat
8	1	0.096	0.007	7.8	0.015	15.6	0.71

*統計解析はISO 5725-2:1994に従う

室間試験で妥当性が確認された方法は信頼性が高く、論文よりも分析手順が詳細に記載されている。FI-HG-AASにより分析を試みようとする場合は是非参考にされたい。その他にも室間試験により妥当性の確認された分析方法として、酵素を用いて抽出しHPLC-ICPMSにより分析する方法⁷や、農林水産省消費安全局が室間試験をおこなった希硝酸を用いて抽出

し HPLC-ICPMS により分析する方法⁸がある。また、アメリカ食品医薬品局 (USFDA) では米中無機ヒ素の分析法及びその精度管理例を HP で公開しており⁹、こちらも参考になる。農環研でおこなわれている農水省委託プロジェクトでの分析においては、限られた時間、資源で非常に多くの試料を分析する必要があり上記の分析法では対応できない。そこで、上記の方法を参考に分析条件を一部変更し多検体分析に適するように改良した。図 2 では、上記の分析方法に加えて農環研でおこなわれている分析方法のフローを比較した。

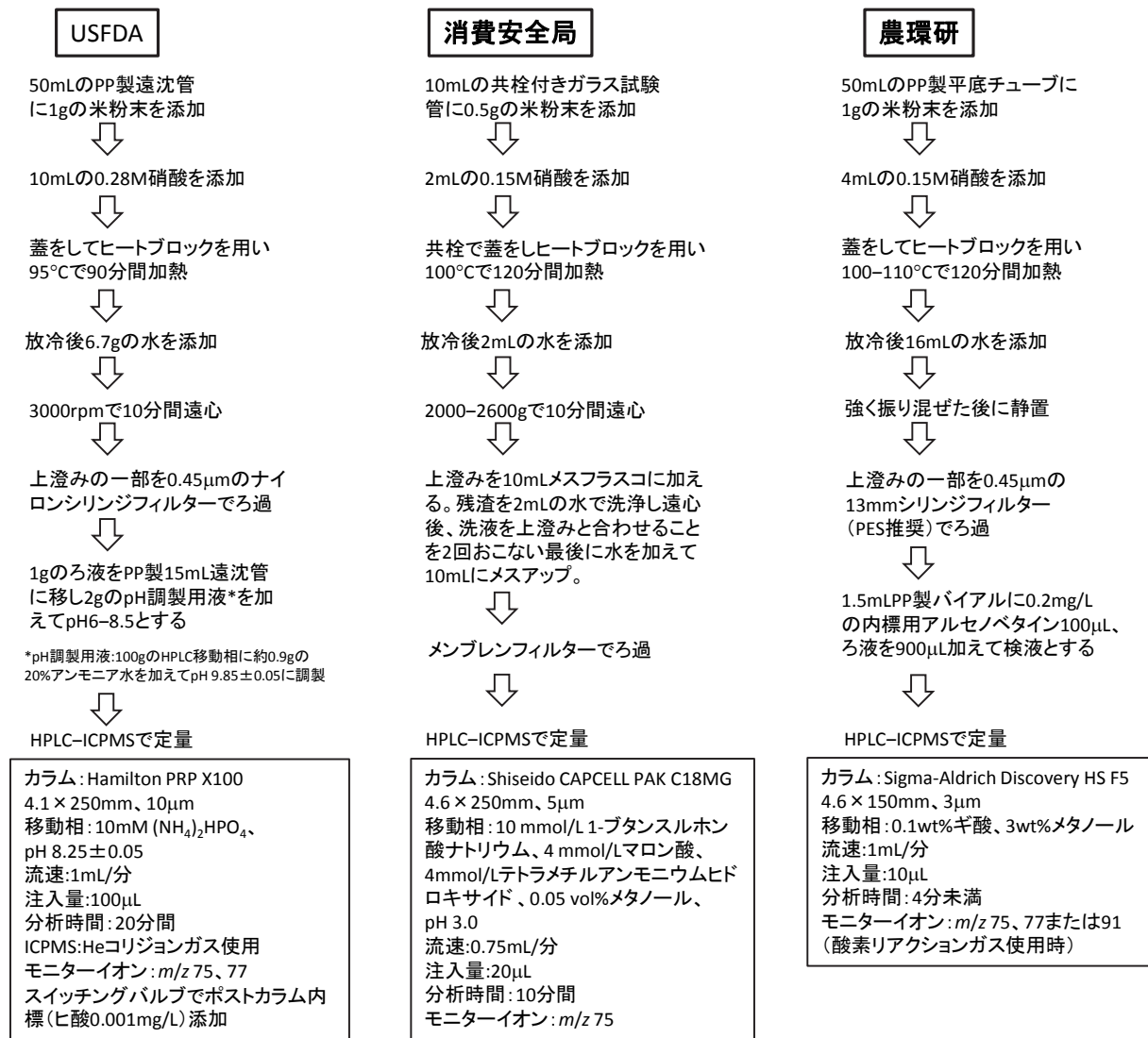


図 2. HPLC-ICPMS による米中無機ヒ素分析法の比較

図 2 で挙げた 3 つの方法はどれも硝酸抽出し、HPLC-ICPMS で分析していることは共通であるが以下主な相違点を述べる。

①HPLC カラム

最も大きな相違点は分離に使用する HPLC カラムであり、それぞれ分離メカニズムが基本的に異なる。USFDA では陰イオン交換分離を利用する Hamilton PRP X100 を用いる。これは、ヒ素の化学形態別分析において最も実績のあるカラムであり、実際、表 4 の室間比較試験でも 75%以上が使用していた。消費安全局の室間試験で使用した Shiseido CAPCELL

PAK C18MG は逆相カラムであり、移動相のブタンスルホン酸ナトリウムによるイオンペア逆相分離を利用している。このカラムによる分離は元々国内で開発されたこともあり、国内での使用実績も高く発表者も長らく利用させていただいた。シリカ系逆相である C18MG はポリマーカラムである PRP X100 に比べて価格も 1/3 以下であり、分析時間も PRP X100 に比べて半分であることから今でも利用価値の高いカラムである。しかし、両カラムとも分離にはそれぞれリン酸緩衝液やブタンスルホン酸ナトリウムなど不揮発性移動相を使っているため、連日の長時間分析では塩の析出による感度の低下や不安定化が起こる場合がある。分析の頑健性を高めて長期間安定した分析ができるように農環研では揮発性移動相でも分離できる Sigma-Aldrich Discovery HS F5 カラムを利用している (図 3)。このカラムではペンタフルオロベンゼンを官能基に持ち、F との水素結合や静電反発を利用した特異な分離メカニズムでヒ素化合物を分離する¹⁰。F5 カラムは C18MG に比べて 2 万円程度高額だが、分析時間が C18MG の半分以下であるため、ICPMS でのランニングコストの大部分を占めるアルゴンガス代を節約できる。また、不揮発性移動相を使った分析より装置のメンテナンス頻度が軽減される利点もある。

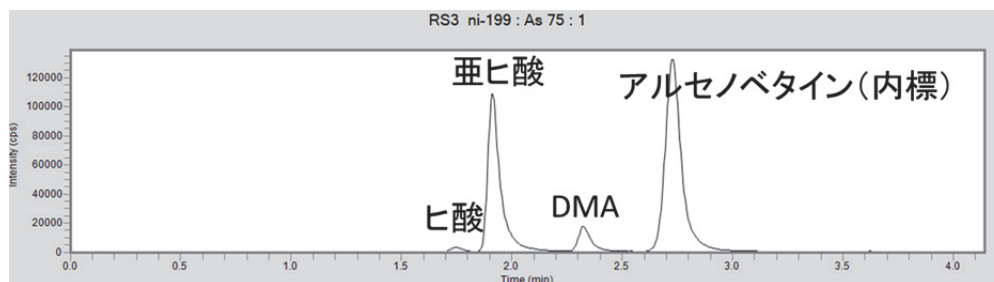


図 3. Discovery HS F5 カラムと揮発性移動相を用いた米中ヒ素の化学形態別分析

②抽出条件

抽出に硝酸を使用するのは同じだが、その濃度については USFDA では 0.28 mol/L、消費安全局の室間試験法や農環研では 0.15 mol/L を利用している。0.15 mol/L 程度の濃度での抽出の場合、抽出時にヒ酸の一部が亜ヒ酸に還元されるという報告¹¹があり、実際に発表者も確認している。0.28 mol/L での抽出はヒ酸から亜ヒ酸への還元が抑制されるという報告があり、それが当初は 0.28 mol/L とした原因の 1 つであったかもしれない (USFDA でもあくまで亜ヒ酸、ヒ酸分別定量ではなく無機ヒ素の分析法であるとしている)。なお、低濃度とは言え、どちらかというとな酸化硝酸抽出でなぜ還元が起こるのかは、次のように考えられている。表 2 で示されたように米中ヒ素の大部分はシステイン残基由来のチオールと結合している。抽出時の酸加水分解でフリーの亜ヒ酸と SH 基になると、SH 基は系内のヒ酸を亜ヒ酸に還元する。同じ論文で 0.7 mol/L を超えた濃度辺りから亜ヒ酸からヒ酸への酸化が見られていることから単純に還元と酸化が釣り合っただけではないかと考えられる。また、0.3 mol/L の抽出で 0.15 mol/L の抽出よりヒ酸が減少したという相反する報告¹²もある。では、別の観点から酸濃度は 0.28 mol/L が良いのか 0.15 mol/L が良いのか考えてみる。米の抽出では酸濃度が薄いほど、デンプンの加水分解が不十分となり抽出液の粘性が増大し、ろ過が困難となる。また、酸濃度が移動相に比べて高すぎるとピーク分離に影響を与えるので USFDA のように抽出液の pH を調整しない場合は適度な酸濃度での抽出が望まれる。使用

している F5 カラムでは 0.15 mol/L でも 0.28 mol/L でも 10 μ L 注入程度ではピーク分離には影響を与えないのでどちらでも良い。農環研ではプロジェクト当初 0.15 mol/L 硝酸、100°C、2 時間抽出をおこなっていたが抽出が十分進んでいない場合もあり、現在では 110°C としている（PP 材質ではほぼ上限）。0.15 mol/L 硝酸抽出における抽出温度を検討した論文¹³では 100°C での抽出で 90-100%の抽出効率を得ており、その論文を元にした消費安全局の方法でも 100°C としている。しかし、両方法ともガラス試験管を使っており、使い捨ての PP 製容器を使って抽出をおこなう場合にはガラスより低い熱伝導度のため、より強い抽出条件が必要なようである。発表者はガラス試験管と PP 製試験管を用いて 0.15 mol/L 硝酸、100°C、2 時間抽出（各 5 本試験）をおこなったところガラス試験管では全てが黄色抽出液となり、米粉も黄色く着色していたが、2 本の PP 製試験管では黄色い着色がほとんど見られなかった。PP 製試験管の抽出液を分析し分散分析すると有意水準 5%で有意差があり、黄色い抽出液の方が平均値で 7%程度高濃度であった。このことから PP 製容器を使った抽出では温度を 110°C とし、抽出液が黄色くなることを指標としている。

4. 米中無機ヒ素の簡易分析

米中無機ヒ素の簡易分析についてはこれまで報告例は無いが、水試料や土壌試料であれば各種報告がある。ヒ素濃度は低いを試料マトリクスによる影響も少ない河川水や地下水など水試料については、Gutzeit 法¹⁴を利用したキットが各社から販売されており広く利用されているが、水試料以外への適用については報告が無い。また、平成 22 年に施行された土壌汚染対策法への対応として東京都が公募した土壌試料中無機ヒ素の簡易分析法として、ストリップングボルタンメトリー法（電気化学測定法の 1 種）が提案されたが、発表者による予備検討では米抽出液では有機物含量が高く電気化学測定では明瞭なピークが見られず適用できなかった。そこで Gutzeit 法について、その改良により米抽出液への適用を検討した。

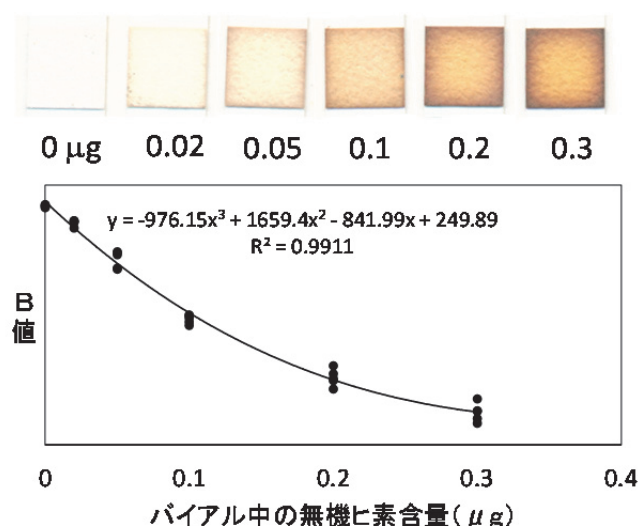


図 4. ヒ酸標準液からの検量線作成：上図 反応後呈色した試験紙、下図 検量線（3 日間試験、n = 5）

分析法の詳細についてはまだ明らかにはできないが、試験紙に塗布した試薬と抽出液中の無機ヒ素から発生したアルシンガスを反応させ呈色し、その色を解析し定量化する手法である（図 4）。呈色を RGB 解析した B 値と無機ヒ素含量に相関があるのでヒ酸標準溶液から回帰式（2 次または 3 次の多項式）を作成し実試料に適用した（表 6）。低ヒ素濃度米、高ヒ素濃度米とも機器分析値とよく一致し、米抽出液の分析に適用できることが示された。

表 6. 米抽出液の無機ヒ素簡易分析結果

	HPLC-ICPMS	簡易分析
高ヒ素濃度玄米 (mg/kg)	0.288 ± 0.018	0.276 ± 0.007
低ヒ素濃度玄米 (mg/kg)	0.073 ± 0.011	0.072 ± 0.005

平均値 ± 標準偏差、米：機器分析：n = 2、簡易分析：n = 5。固液比 1:4 で抽出後、抽出液を 20 倍に希釈して HPLC-ICPMS 分析、簡易分析は抽出液を 5 倍に希釈して分析。

本簡易分析法は分析用天秤やピペッター、スターラーがあれば追加の初期費用は約 3 万円程度、1 検体当たりの分析コストは 120 円程度で分析できることが試算されており、また毒劇物や有機溶媒を使用しない利点もある。今後の普及のため、さらに検討を重ねていく予定である。

5. おわりに

米中ヒ素の化学形態別分析については農環研において 1,000 点/年以上分析しており、精度管理も含めて多検体分析の実績を積んできた。今発表上では挙げなかった実用上の注意点なども多いので、これから始めてみようとする場合は気軽にご相談いただきたい。また、開発中の簡易分析法は今後必要な修正の後、室間試験をおこなう予定であり、その際には是非協力をお願いしたい。

6. 謝辞

本発表の中で紹介された米中ヒ素化合物の化学形態別分析並びに簡易分析法の開発については、農林水産省委託プロジェクト（研究課題「水稻におけるヒ素のリスクを低減する栽培管理技術の開発」）の研究成果です。

参考文献

- 1) 国産玄米及び精米中のヒ素の含有実態調査の結果について（平成 24 年度）
<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/pdf/140221-01.pdf>
- 2) Batista B.L. et al. (2011) Speciation of arsenic in rice and estimation of daily intake of different arsenic species by Brazilians through rice consumption. *J. Hazard. Mater.* 191: 342–348.
- 3) Hansen H.R. et al. (2011) Identification of tetramethylarsonium in rice grains with elevated arsenic content. *J. Environ. Monit.* 13: 32–34.
- 4) Lombi E. et al. (2009) Speciation and distribution of arsenic and localization of nutrients in rice grains. *New Phytologist* 184: 193–201.
- 5) 2013 Brooks Rand Labs Interlaboratory Comparison Study for Arsenic Speciation in Food and Juice <http://www.brooksrand.com/wp-content/uploads/2014/02>

/Report+for+BRL+As+Spec+in+Food+Intercomp+2013.pdf

- 6) IMEP-41: Determination of inorganic As in food.
<https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/IMEP-41%20Final%20report1.pdf>
- 7) Dufailly V. et al. (2011) Validation of a method for arsenic speciation in food by ion chromatography-inductively coupled plasma/mass spectrometry after ultrasonic-assisted enzymatic extraction. *JAOAC Int.* 94(3): 947-958.
- 8) Ukena T. et al. (2014) Speciation and Determination of Inorganic Arsenic in Rice Using Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry: Collaborative Study. *JAOAC Int.* 97(3):946-955.
- 9) Arsenic Speciation in Rice and Rice Products Using High Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Determination
<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/UCM479987.pdf>
- 10) Baba K. et al. (2014) Chromatographic separation of arsenic species with pentafluorophenyl column and application to rice. *J. Chromatogr. A* 1354: 109-116.
- 11) Huang J-H. et al. (2010) Quantitative chemical extraction for arsenic speciation in rice grains. *J. Anal. At. Spectrom.* 25: 800–802.
- 12) Narukawa T. et al. (2014) Extraction techniques for arsenic species in rice flour and their speciation by HPLC–ICP-MS. *Talanta* 130: 213-220.
- 13) Nishimura T. et al. (2010) Determination method for total arsenic and partial-digestion method with nitric acid for inorganic arsenic speciation in several varieties of rice. *Food Hyg. Saf. Sci. Jpn.* 51(4): 178-81.
- 14) Sanger C. R. et al. (1907) The Quantitative Determination of Arsenic by the Gutzeit Method. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* 43(8): 297-324.