

り、測定値が著しく高いケースが見られ、尿中の他成分が測定に影響を及ぼしていると推察された。したがって、本法では尿中水銀濃度の定量は困難であると判断された。しかし、各人の添加尿の測定値は、いずれの被験者においても健常時の水銀排泄量よりも明らかに高かった。したがって、中毒の際、健常時の10倍程度量の水銀が尿中に排泄されれば、中毒原因元素の特定は可能であると考えられる。

表4. 健常人における砒素、カドミウム、鉛の尿中濃度(μg/L)

被験者	As	Cd	Pb
A	46	4.9	3.2
B	365	5.3	1.5
C	151	5.2	1.3
D	96	4.2	1.2
E	240	4.1	1.7
平均	180	4.8	1.8
標準偏差	126	0.6	0.8

表5. 尿における添加回収試験結果

被験者		As	Cd	Pb	Hg
A	回収率(%)	100	84	96	1363
	CV(%)	2.2	1.5	2.3	11.0
B	回収率(%)	102	82	99	76
	CV(%)	3.3	1.5	1.2	38.4
C	回収率(%)	104	82	101	175
	CV(%)	2.4	3.6	4.3	55.1
D	回収率(%)	107	87	99	806
	CV(%)	1.0	1.0	1.7	44.9
E	回収率(%)	79	84	105	67
	CV(%)	5.9	1.2	9.3	14.1
平均	回収率(%)	99	84	100	293
	CV(%)	3.0	1.8	3.8	245.0

添加量: 尿中濃度として2400 μg/L (ヒ素)および24 μg/L (カドミウム、鉛、水)

C-3. 分析マニュアル

C-3-1. 全体の構成

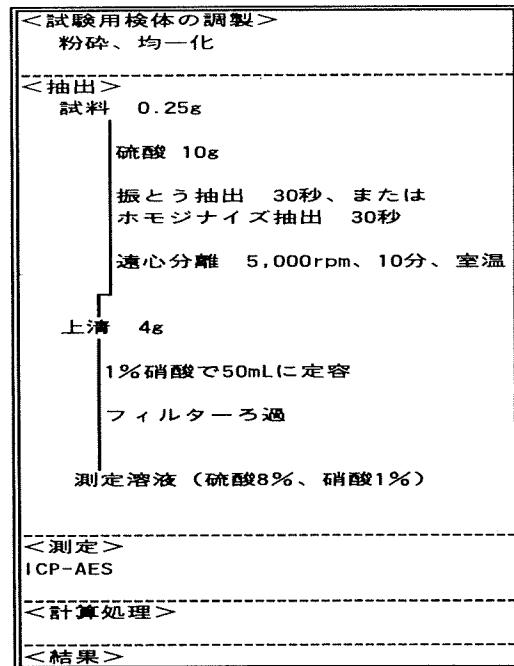
作成したマニュアルを別紙1、2および3に示す。マニュアルの構成は以下のである。

- I. 試薬類
- II. 装置
- III. 器具等
- IV. 試料溶液および標準液の調製
- V. 定性・定量
- VI. 計算式
- VII. 判定
- VIII. 文献
- IX. フローシート

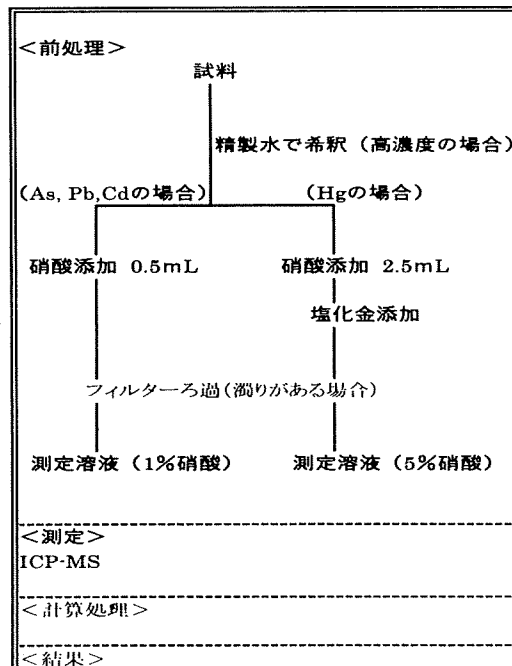
C-3-2. フローシート

食品、水および尿の迅速測定法のフローシートを以下に示す。

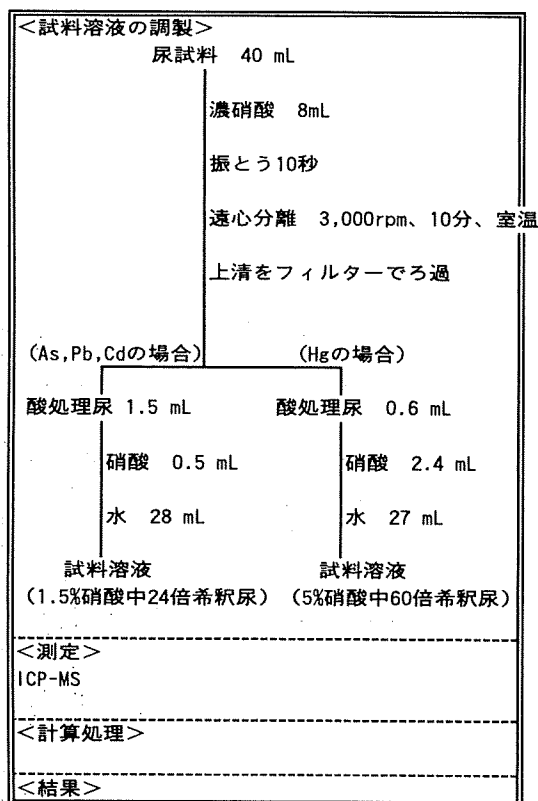
①食品



②水



③尿



F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 野村千枝, 尾花裕孝, 織田肇: 健康危機対応を目的とした食品中有害重金属等の迅速分析法の検討, 食品衛生学雑誌, 50(5), 253-255 (2009)

2. 学会発表

- 1) 野村千枝, 北川幹也, 尾花裕孝: 食品中に混入された重金属の迅速簡易分析法の開発. 第96回日本食品衛生学会学術講演会, 神戸, 2008

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

D. 考察

今回構築した酸希釈法では、食品の場合、ヒ素、水銀、カドミウムおよび鉛を適切に測定できることがわかった。また、水および尿の場合、ヒ素、カドミウムおよび鉛では適切に測定できることがわかった。水および尿中の水銀については、定量は困難であるが、健康危機時のように高濃度の場合には確認できるため、使用できる。また、酸希釈法を用いれば、測定時間を2時間程度に短縮できるとともに、操作も簡便化できる。さらにマニュアルを作成したので、健康危機発生時には、構築した迅速分析法を的確に適用できると考えられる。

E. 結論

今回構築しマニュアル化した迅速分析法を使用すれば、重金属による健康危機発生時に短時間で原因特定が可能である。

第2部. マイクロウェーブ分解法

A. 研究目的

重金属を測定する際の試料の前処理法の一つとして硝酸や硫酸等を用いて試料成分を分解する酸分解法がある。従来からのケルダールフラスコを用いた湿式分解法は時間を要することから、本研究では健康危機発生時に対応できる迅速で網羅的な重金属の検査法を確立するために、マイクロウェーブ分解装置を用いた前処理法を検討した。マイクロウェーブ分解装置の地方衛生研究所での普及率は、まだそれほど高くない。本装置の環境試料の分解への応用例は多いが、食品への応用はこれまで少なかった。しかし堅い固形試料も短時間で分解が可能であるため、食品分析においても有用性が期待できる装置である。そこで検査項目を、健康危機管理上優先順位が高い重金属（ヒ素、水銀、カドミウム、鉛）とし、対象試料には食品試料として玄米及び清涼飲料水を、生体試料として頭髪を用い、それぞれの試料におけるマイクロウェーブ分解の条件を検討した。確立した分析法を検証した後、検査法のマニュアル化を行った。

B. 研究方法

B-1. マイクロウェーブ分解法を用いた迅速分析法の検討

B-1-1. 測定機器における条件検討

ICP-MSによるカドミウム、鉛、ヒ素の多成分分析を行うための測定条件を検討した後、各元素について検量線を作成した。10ppmのカドミウム、鉛、ヒ素を含む市販の混合標準液を2%硝酸で希釈し、1、2、5、10、20、50、100ppbの7点の濃度で検量線用標準液を作製した。各標準溶液5mlに、1000ppb溶液に希釈した内標

準のインジウム標準溶液を50 μ Lずつ加えてよく混合した後、検討したICP-MSの条件で測定を行った。得られた測定結果より、検量線を作成した。水銀については別途マイクロウェーブ分解粗抽出液の一部をとり、還元気化水銀分析計を用いて分析を行うこととした。水銀分析計はゼロと10ppbの2点検量線で測定した。

B-1-2. マイクロウェーブ分解における条件検討

代表的な食品試料として玄米と清涼飲料水を、生体試料として頭髪を用いて、マイクロウェーブ分解装置における分解条件を検討した。

B-2. 迅速分析法の検証

B-2-1. 食品試料（玄米）

予め濃度が定められている認証値付き標準試料の分析と添加回収試験によって迅速分析法の検証を行った。認証値つき標準試料は環境標準試料（国立環境研究所，NIES CRM No.10 玄米粉末）を使用した。

試料約0.5gをマイクロウェーブ分解用容器に精秤し、これに濃硝酸8mLを加えた。しばらく放置した後、カバーを取り付けてマイクロウェーブ分解を行った。30分冷却した後、ドラフト内で容器のフタを開け、褐色の煙が出なくなるまで放置した。分解が不十分な場合は（玄米の場合）、さらに濃硝酸2mLと過酸化水素0.5mLを加え、再びマイクロウェーブ分解を行った。分解液を20mLスフラスコに入れ、濃硝酸で洗い込みながらメスアップした。

メスアップした前処理後の試料を一部採取し、水銀は高感度還元気化水銀装置で、その他の金属（Pb、Cd、As）はICP-MSで測定した（図1）。

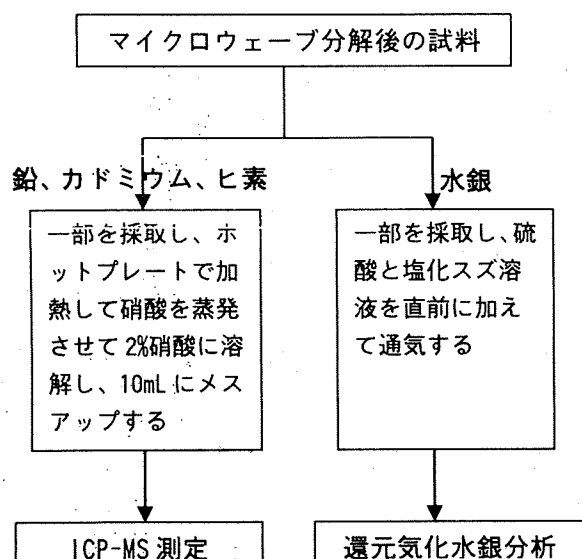


図1 試料液の重金属測定方法

水銀測定はマイクロウェーブ分解後すぐに行った。20mLにメスアップした各試料から0.8mLを専用の発生瓶に採取した。これに、蒸留水18.2mLと硫酸1mLを入れて軽く振り混ぜた。測定の直前に塩化スズ溶液1mLを加えた後、通気することにより、水銀蒸気を発生させ、原子吸光法で検出・定量した。

鉛、カドミウム、ヒ素の測定用として分解後の試料液を10mL正確に採取してテフロンビーカーに入れ、硝酸を蒸発させるために170°Cのホットプレート上で加熱した。液量が1mL以下まで蒸発させた後、2%硝酸を3mL加えてよく溶解させた後、再び加熱した。この操作を2~3回繰り返した後、2%硝酸を3mL加えてよく溶解させ、10mLメスフラスコに移した。2%硝酸で洗い込みながらメスアップした。メスアップした試料液を15mLのポリプロピレン製の容器に5mL採取した(金属濃度が濃い試料は希釈した)。また、検量線用標準溶液(1、2、5、10、20、50、100ppbの7点の濃度で調製したもの)も同様に5mL採取した。採取した各標準溶液及び試料溶液に1000ppbに調製した内標準のイン

ジウム標準溶液を50μLずつ加えてよく混合した後、ICP-MSで測定を行った。

B-2-2. 食品試料(清涼飲料水)

清涼飲料水の試料は標準試料が入手できなかったため市販品を用いて添加回収試験を行った。玄米と同様の分析方法で重金属類の測定を行い、分析法を検証した。

B-2-3. 生体試料(頭髪)

生体試料として頭髪を用いた。認証値付きの標準試料の測定と添加回収試験によって分析法の検証を行った。試料は環境標準試料(国立環境研究所, NIES CRM No.13 頭髪)を使用した。重金属類の測定は、試料採取量を0.1gとし、その後の分析操作は玄米と同様の方法で行った。

B-3. 分析マニュアルの作成

今回確立したマイクロウェーブ分解を用いた食品および生体試料中重金属の迅速分析法のマニュアルを作成した。

C. 結果

C-1. マイクロウェーブ分解法を用いた迅速分析法の検討

C-1-1. 測定機器における条件検討

ICP-MSにおいて、鉛、カドミウム、ヒ素について1-100ppbの範囲で7点の濃度の標準溶液を測定して検量線を作成したところ、いずれの元素についても良好な直線性が得られた。水銀は還元気化水銀分析計を用いて、波長253.7nmで測定を行った。また、実験に使用する水(蒸留水及び超純水)における鉛、カドミウム、ヒ素、水銀のブランク値を測定した結果、いずれも0.2ppb以下であり、健康被害発生時の食品

等の検査に問題なく使用可能であると考えられた。各元素の試料における定量下限値は、玄米及び清涼飲料水で 0.04ppm、頭髮で 0.2ppm であった。

C-1-2. マイクロウェーブ分解における条件検討

マイクロウェーブ分解装置を用いて、3種類の試料（食品の固形試料として玄米、液体試料として清涼飲料水、生体試料として頭髮）の前処理を試みた。分解前に加える硝酸の量は 8mL とし、表 6 に示すプログラムで試料の分解を行った。清涼飲料水及び頭髮は、いずれの試料も 1 回の分解で無色透明な分解液が得られた。しかしながら、玄米は 1 回の分解では分解液がまだ暗緑色を呈し、有機物がかなり残存することを示していたため、さらに過酸化水素 0.5mL と硝酸 2mL を加えて再び同じプログラムで分解を行った。2 回目の分解後は淡黄色の分解液を得ることができたことから、玄米試料はマイクロウェーブの分解を 2 回行うこととした。分析に用いる試料の量は玄米及び清涼飲料水は 0.5g とし、頭髮については 0.1g とした。

表 6 マイクロウェーブ試料前処理装置の条件

ステップ	時間 (分)	出力 (w)	温度 (°C)
1	2	1000	50
2	3	0	30
3	13	1000	185
4	1	0	155
5	4	1000	185
6	17	1000	185

C-2. 迅速分析法の検証の結果

C-2-1. 食品試料（玄米）

予め濃度が値付けされている認証値付きの玄米の環境標準試料を用いて、マイクロウェーブ分解を用いた迅速分析法の検証を行った。マイクロウェーブ分解装置で環境標準試料を前処理した後、ICP/MS 及び水銀分析計で測定し、定量値と認証値を比較した。各元素の値を表 7 に示す。また、認証値と定量した値がどのくらい一致しているかを定量値と認証値の比を算出して示した。その結果、ヒ素、カドミウムの定量値は認証値に近い値であった。水銀は環境標準試料中に極微量にしか含まれておらず、検出下限値以下であった。また、鉛は認証値がなかったため比較できなかった。

次に、試料に標準液を添加し、添加回収試験 (n=5) を行った。その結果を表 8 に示す。いずれの元素においても回収率の平均値は 80～120% の範囲で良好な回収率が得られた。鉛については値のばらつきを示す RSD の値が 20% を超えたことから、若干ばらつきがあると思われた。

表 7 環境標準試料（玄米）の定量値及び認証値

元素	認証値 (µg/g)	定量値 (µg/g)	定量値/認証値
As	0.11	0.084	0.76
Cd	0.32	0.31	0.96

表 8 玄米試料における各元素の添加回収率 (n=5)

元素	平均値 (%)	RSD (%)
As	91.3	4.6
Cd	99.4	2.1
Pb	118.7	21.9
Hg	95.3	7.2

C-2-2. 食品試料（清涼飲料水）

清涼飲料水については認証値のついた標準試料が入手できなかったため、市販の清涼飲料水に標準液を添加して、添加回収試験のみを行った。その結果、表9に示すようにいずれの元素も80~120%の範囲で良好な回収率が得られた。RSDについても15%以内の良好な値が得られた。

表9 清涼飲料水における各元素の添加回収率 (n=5)

元素	平均値 (%)	RSD (%)
As	81.6	4.3
Cd	84.2	2.6
Pb	109.3	14.8
Hg	87.4	7.6

C-2-3. 生体試料（頭髪）

頭髪試料の環境標準試料における定量値及び認証値を表10に示す。カドミウム、水銀については認証値との比が0.8~1.2の範囲にあり、良好な結果が得られた。ヒ素と鉛については認証値よりも高めの値であった。原因としてはICP-MS測定における試料中のマトリックスの影響等が考えられる。添加回収試験の結果を表11に示す。鉛と水銀については添加前の試料中含有量が高かったため、回収率を算出できなかった。ヒ素、カドミウムは回収率の平均値、RSDとも良好な値であった。

表10 環境標準試料(頭髪)の定量値及び認証値

元素	認証値 (μg/g)	定量値 (μg/g)	定量値/認証値
As	0.10	0.15	1.48
Cd	0.23	0.28	1.20
Pb	4.6	7.43	1.62
Hg	4.42	5.09	1.15

表11 頭髪試料における各元素の添加回収率 (n=4)

元素	平均値 (%)	RSD (%)
As	91.6	2.8
Cd	95.6	2.0

C-3. 分析マニュアル

C-3-1. 全体の構成

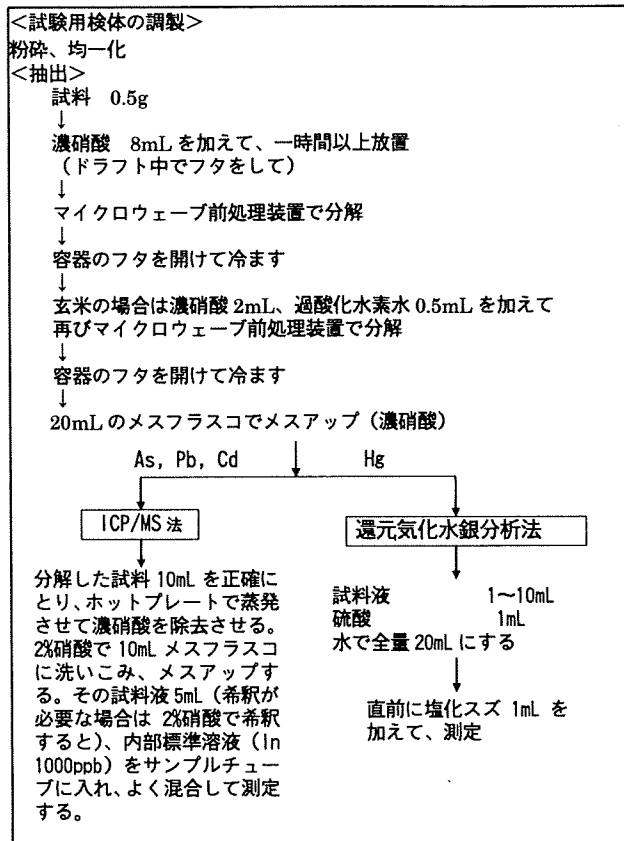
分析対象の試料別（食品試料及び生体試料）にマイクロウェーブ分解装置を用いた迅速分析法の検査マニュアルを作成した。

検査マニュアルの構成は、I. 試薬類、II. 装置、III. 器具等、IV. 試料溶液および標準液の調製、V. 定性・定量、VI. 計算式、VII. 判定、VIII. 文献、IX. フローシートとした。作成したマニュアルを別紙4及び5に示す。参考資料として、分析法の検証を行った際の標準試料の分析値や添加回収試験の結果を記載した。カドミウム、鉛、ヒ素、水銀以外の8元素（クロム、コバルト、銅、セレン、タリウム、ニッケル、マンガン、亜鉛）についても検討した結果を記載した。また、マイクロウェーブ分解装置や、ICP-MSを用いて重金属を分析する場合の注意点について記載することとした。迅速分析法の検討を通して得た情報を整理しマニュアル化することにより、検査に有用な情報を共有化できるようにした。

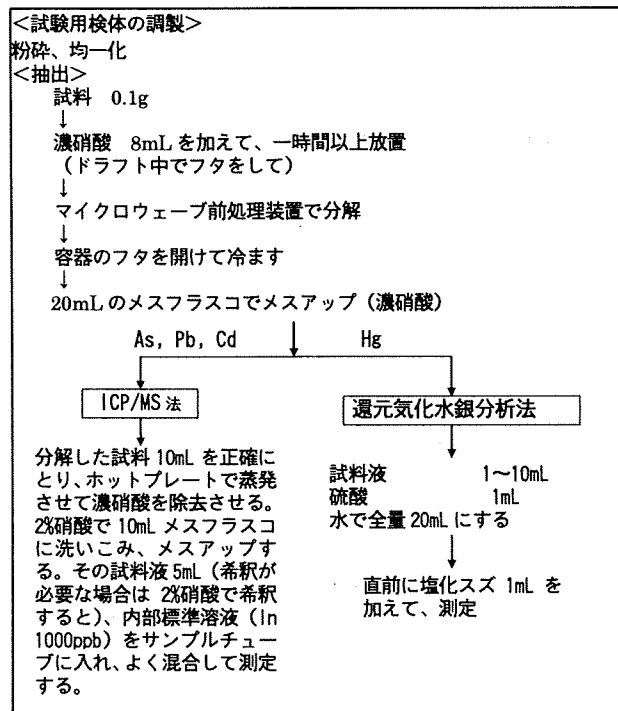
C-3-2. フローシート

作成した分析法のフローシートを以下に示す。対象試料ごとに作成し、検査法の流れが容易に把握できるようにした。

① 食品試料



② 生体試料



D. 考察

健康危機発生時に対応するための迅速な前処理装置として、マイクロウェーブを用いた方法の検討を行い、食品試料及び生体試料を用いて分析法の検証を行った。その結果、ほぼ良好な結果が得られ、健康危機発生時の検査法として適用できることがわかった。検査時間については、従来の湿式分解/原子吸光法の半分以下の時間で検査が可能であり、一日で結果を出すことが可能と考えられた。健康被害発生時に対応するため、マイクロウェーブ分解法を用いた迅速分析法の検査マニュアルを作成した。検査の流れが一目でわかるようにフローシートを作成し、さらに参考資料として迅速分析法の検証結果、迅速分析法を用いる際の注意点を整理したものを作成した。これらのマニュアルを活用することにより、今後、より迅速で網羅的な検査が可能となる。

E. 研究危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 芦塚由紀, 岡本華菜, 山本重一, 中川礼子: マイクロウェーブ分解装置を用いた重金属の迅速分析法の検討, 福岡県保健環境研究所年報 第36号, 61-66 (2009)

2. 学会発表

1) 芦塚由紀, 岡本華菜, 山本重一, 中川礼子: マイクロウェーブ分解装置を用いた食品中重金属の迅速測定法について, 第30回九州衛生環境技術協議会, 大分, 2009

G. 知的所有権の取得情報

なし

別紙 1

健康危機管理時における食品中の重金属迅速分析マニュアル (ヒ素、鉛、水銀、カドミウム)

I. 試薬類

1. 標準品

ヒ素 (As)、鉛 (Pb)、水銀 (Hg)、カドミウム (Cd) 標準原液 (1,000 mg/L(ppm)) : JCSS 認定、和光純薬工業製等、冷所 (25℃以下) 保存 (使用期限 : 容器に記載)

2. その他の試薬等

- 1) 硫酸 : 有害金属測定用
- 2) 硝酸 : 有害金属測定用
- 3) 水 : 純水製造装置により精製したもの
- 4) 1%硝酸 : 硝酸 1 mL に水を加え、100 mL に定容する。
- 5) 8%硫酸 : 水約 90 mL に硫酸 8 g を加え、放冷後 100 mL に定容する。

II. 装置

- 1) 純水製造装置 : 日本ミリポア製 MILLI Q SP.TOC.等
- 2) 上皿天秤 (実感量 0.01 g で測定できるもの)
- 3) ホモジナイザー (ディスポーザブルタイプのシャフトが使用できるもの)
: キアゲン製 TissueRuptor™等
- 4) 高速遠心機 (50mL PP 遠沈管を 5,000 rpm で遠心できるもの)
: 日立工機製 himac SCR20B 等
- 5) 高速振とう機 (50mL PP 遠沈管を振とうできるもの)
- 6) マイクロピペッター
- 7) 誘導結合プラズマ発光分析装置 (ICP-AES) : 島津製作所製 ICPS-7510 等

III. 器具等

- 1) 50 mL ポリプロピレン製遠沈管 (50 mL PP 遠沈管)
- 2) ディスポーザブルタイプのホモジナイザーシャフト : TissueRuptor Disposable Probes 等
- 3) メンブランフィルター : 親水性 PTFE、φ13 mm、0.20 μm(必要に応じてプレフィルターを用いる)、アドバンテック東洋製 DISMIC 等
- 4) 12 mL ディスポシリンジ : アズワン製 PP ディスポシリンジ等
- 5) 10 mL PP 遠沈管 : 栄研化学製丸底スピッツ等
- 6) チップ

- 7) 駒込ピペット各種： PP 製が望ましい。
- 8) プラスチック製手袋、マスク等

IV. 試料溶液および標準液の調製

1. 試料溶液^{※1}

1) 試験用検体の調製

ポリ袋やフードプロセッサー等で粉碎・均一化する。

2) 抽出

試料 0.25 g を 50 mL PP 遠沈管に採り、硫酸 10 g^{※2, ※3}を加え、振とう抽出、あるいはホモジナイザーで 30 秒間抽出する。必要であれば、室温毎分 5,000 回転で 10 分間遠心分離する。上清 4 g を 50 mL PP 遠沈管に採り、1%硝酸で 50 mL に定容し、抽出液とする。これをメンブランフィルターでろ過し試料溶液とする。

2. 標準溶液（別紙参照）^{※1}

標準原液を 1%硝酸および 8%硫酸を含む水溶液で 0.01~0.5 µg/mL(ppm) になるように調製する（用時調製）。

※1 試料溶液および標準溶液の調製は、器具からの汚染を避けるためメスフラスコおよびホールピペットの代わりに、50 mL PP 遠沈管等のディスポーザブル容器およびマイクロピペットを用いて調製する。

※2 酸使用時には、手袋およびマスクをして取り扱う。手袋はプラスチック製が望ましい。

※3 明らかに有機物を多く含有せず、かつアスコルビン酸等の酸化防止剤の表示が無い場合は、10%硝酸 10 mL を用いて抽出しても良い。この場合、標準溶液の作成には、硫酸の代わりに 10%硝酸を用いる。

V. 定性・定量

標準溶液および試料溶液を ICP-AES に導入する。標準溶液については、それぞれの金属の発光強度を測定し、検量線を作成する。試験溶液についても、同様にそれぞれの金属の発光強度を測定し、VI の計算式より試料溶液中の金属の濃度を算出する。ICP-AES の測定条件例を以下に示す。

[ICP-AES 測定条件例]

装置：ICPS-7510
周波数：27.120 MHz
高周波出力：1.2 kW
ガス：アルゴン

クーラントガス：12.0 L/min
プラズマガス：1.20 L/min
キャリアーガス：0.70 L/min
光源観測方向：横方向
トーチ観測高：低
チェンバ：サイクロン型
ソルベントリンス：90 sec
サンプルリンス：60 sec
測定波長：As：193.696, Pb：220.351, Hg：194.227, Cd：228.80
2 nm
積分時間：5.0 sec
定性：発光スペクトル
定量：絶対検量線法
定量下限値：As：0.01 µg/mL(ppm)、Pb, Hg, Cd：0.02 µg/mL(ppm)
検量線範囲：As：0.01～0.25 µg/mL(ppm)、Pb, Hg, Cd：0.02～0.5
µg/mL(ppm)

VI. 計算式

試料中の各元素の含有量 C (mg/kg, ppm) は、次式から求められる。

$$C \text{ (mg/kg, ppm)} = A \text{ (}\mu\text{g/mL, ppm)} \times V \text{ (mL)} \div 4 \text{ (g)} \times 10 \text{ (g)} \div W \text{ (g)}$$

A：検量線から得られた試験溶液中の各元素の濃度 (µg/mL, ppm)

W：試料採取量 (g) 通常は 0.25 g

V：測定溶液量 (mL) 通常は 50 mL

VII. 判定

判定は以下の通りを行う。

定量下限値は標準溶液中濃度として As 0.01 µg/mL(ppm)、その他 3 元素 0.02 µg/mL(ppm)とし、また試料中含有量として As 5 mg/kg(ppm)、その他 3 元素 10 mg/kg(ppm)となる。各元素と同一のスペクトルが認められない場合、またはスペクトルが認められるがその発光強度が定量下限相当量未満である場合「ND」とする。

VIII. 文献

- 1) 野村千枝, 尾花裕孝, 織田肇, 健康危機対応を目的とした食品中有害重金属等の迅速分析法の検討, 食品衛生学雑誌, 50(5), 253-255 (2009)
- 2) 鈴木修, 屋敷幹雄編 “薬毒物分析実践ハンドブック ークロマトグラフィーを中心としてー” 東京, じほう, 2002, p.557-566.(ISBN 4-8407-3004-0)

IX. フローシート

<p><試験用検体の調製> 粉碎、均一化</p>	<p>ポリ袋、フードプロセッサー等</p>
<p><抽出></p> <p style="text-align: center;">試料 0.25g</p> <p style="margin-left: 100px;">硫酸 10g ※</p> <p style="margin-left: 100px;">振とう抽出 30秒、または ホモジナイズ抽出 30秒</p> <p style="margin-left: 100px;">遠心分離 5,000rpm、10分、室温</p> <p style="margin-left: 100px;">上清 4g</p> <p style="margin-left: 100px;">1%硝酸で50mLに定容</p> <p style="margin-left: 100px;">フィルターろ過</p> <p style="margin-left: 100px;">測定溶液（硫酸8%、硝酸1%）</p>	<p>50 mL PP 遠沈管、精密天秤 駒込ピペット 上皿天秤</p> <p>高速振とう機 ホモジナイザー</p> <p>高速遠心機</p> <p>ピペッター、チップ 50 mL PP 遠沈管、上皿天秤 高速振とう機</p> <p>メンブランフィルター （親水性 PTFE、 13mmφ、0.20μm） ディスポリリンジ 10 mL PP 遠沈管</p>
<p><測定> ICP-AES</p>	
<p><計算処理></p>	
<p><結果></p>	

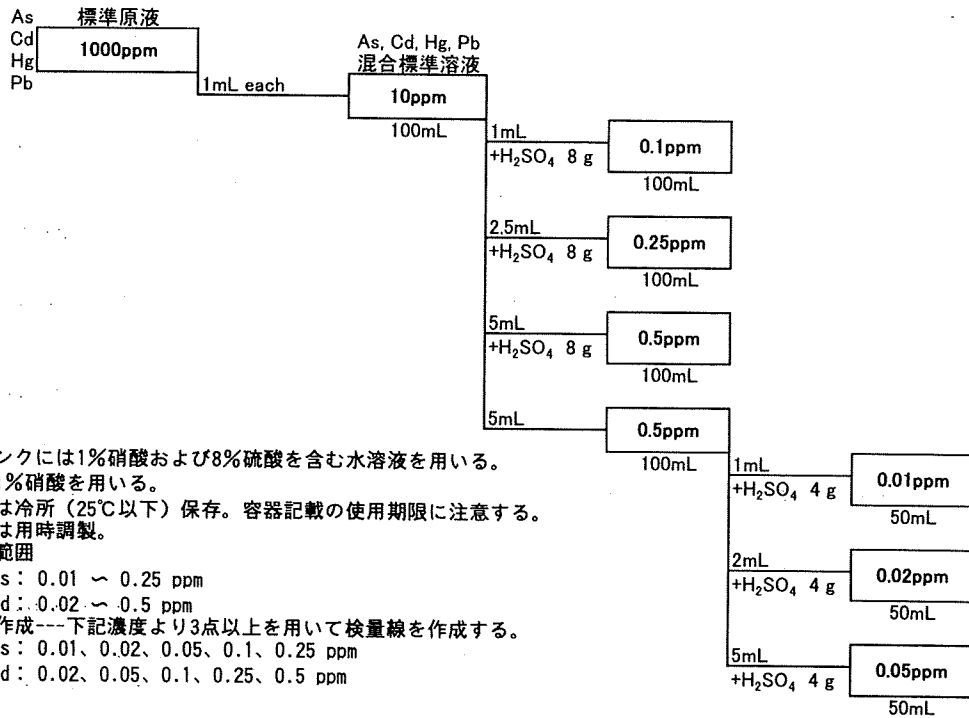
※ 有機物を多く含まず、かつアスコルビン酸等の酸化防止剤の表示がない食品の場合、硫酸の代わりに10%硝酸を用いて抽出しても良い。

標準溶液調製方法

(別紙)

以下の手順で、各濃度の混合標準溶液を調製する。

	標準原液濃度 (ppm)	標準品管理番号	採取量 (mL)	採取日	採取者	備考	廃棄日
ヒ素(As)	1,000						
鉛(Pb)	1,000						
水銀(Hg)	1,000						
カドミウム(Cd)	1,000						



- 測定ブランクには1%硝酸および8%硫酸を含む水溶液を用いる。
- 希釈には1%硝酸を用いる。
- 標準原液は冷所(25℃以下)保存。容器記載の使用期限に注意する。
- 標準溶液は用時調製。
- 検量線の範囲
 - As : 0.01 ~ 0.25 ppm
 - Pb、Hg、Cd : 0.02 ~ 0.5 ppm
- 検量線の作成---下記濃度より3点以上を用いて検量線を作成する。
 - As : 0.01、0.02、0.05、0.1、0.25 ppm
 - Pb、Hg、Cd : 0.02、0.05、0.1、0.25、0.5 ppm

<参考>

○ 希釈に用いる酸の選択

カレーや牛乳などの蛋白質や脂質が多量に含まれる試料の希釈に10%硝酸を用いた場合、Hgを除く3元素については良好な回収率が得られたが、Hgについては牛乳57%、カレー63%とやや低値を示した(表1)。一方、アスコルビン酸(VC)を含む食品(パッケージ記載のVC含量:2,000~7,143 µg/g(ppm))では、Hgの回収率が約210~335%と顕著に高い値を示した。そこで本法では、試料中の蛋白質や脂質、およびアスコルビン酸等の酸化防止剤の除去を目的に、試料の希釈に濃硫酸を用いている。

蛋白質や脂質を多量に含まず、アスコルビン酸等の酸化防止剤の不使用が明確である場合、概ね80%以上の良好な回収率が得られることから、試料の希釈に10%硝酸を用いても良い。

表1. 試料の希釈に10%硝酸を用いた場合と硫酸を用いた場合の水銀の添加回収率の比較
添加濃度: 100mg/kg(ppm)、*: 表示にアスコルビン酸使用の記載あり

試料	平均添加回収率 (%) / RSD (%), n=3	
	10%硝酸	硫酸
水	92/2	100/2
紅茶	96/2	95/3
牛乳	57/8	98/6
カレー	63/12	104/6
発酵乳	114/6	96/5
レモン風味の清涼飲料水*	332/5	116/4
蜂蜜風味の清涼飲料水*	210/4	100/3
レモン風味のゼリー飲料*	335/20	112/4
レモン風味の炭酸飲料*	320/8	102/3

○ 添加回収試験結果

12食品について表2の10元素について5回繰り返し添加回収試験をおこなった結果、Seを除く9元素(As, Cd, Cr, Hg, Mn, Pb, Sb, Sn, Tl)について、平均回収率は71~107%、相対標準偏差は1~13%と良好な結果が得られた(添加濃度: As 20 mg/kg(ppm)、その他9元素 100 mg/kg(ppm))。

表2. 試料の希釈に硫酸を用いた場合の添加回収試験結果

試料	平均添加回収率 (%) / RSD (%), n=5									
	As	Cd	Cr	Hg	Mn	Pb	Sb	Se	Sn	Tl
添加濃度 (mg/kg, ppm)	20	100								
牛乳	90/8	97/2	99/2	99/2	103/2	92/3	102/8	42/12	106/3	98/9
そばめし	100/5	95/1	99/2	93/5	102/3	102/4	97/6	55/11	97/2	100/5
ハヤシライス	102/6	94/4	95/5	94/11	97/2	96/8	87/5	33/14	94/2	97/4
肉焼売	106/4	91/2	93/3	79/9	96/1	93/5	85/6	35/12	93/3	95/6
五目春巻	101/3	90/3	96/3	78/8	95/2	92/5	93/4	22/9	92/2	89/4
豚カルビ焼肉	74/9	92/3	93/2	79/6	94/2	98/9	90/2	26/11	89/5	87/7
クリームシチュー	96/6	91/4	91/3	90/9	91/2	90/5	84/4	48/10	90/2	90/6
ビーフシチュー	92/11	95/4	96/4	84/8	96/2	96/5	93/3	50/9	93/4	94/4
お好み焼き	92/6	93/5	96/5	80/5	95/3	99/6	93/3	40/10	84/5	90/7
餃子	71/8	97/4	103/3	106/13	106/5	96/6	101/5	36/11	99/3	102/3
中華丼の具	99/3	96/2	98/2	88/9	98/2	99/4	95/1	42/11	93/2	98/4
カレー	84/5	102/3	106/3	107/8	107/3	97/5	105/4	71/9	106/1	105/3

別紙 2

健康危機管理時における水中の重金属迅速分析マニュアル

(ヒ素、鉛、水銀、カドミウム)

ICP-MS 法

I. 試薬類

1. 標準品

ヒ素 (As)、鉛 (Pb)、水銀 (Hg)、カドミウム (Cd) 標準原液 (1,000 mg/L(ppm)) : JCSS 認定、和光純薬工業製等、冷所 (25℃以下) 保存 (使用期限 : 容器に記載)

2. 内部標準品

ガリウム (Ga)、インジウム (In)、タリウム (Tl) 標準原液 (1,000 mg/L(ppm)) JCSS 認定、和光純薬工業製等、冷所 (25℃以下) 保存 (使用期限 : 容器に記載)

3. その他の試薬

- 1) 水 : 純水製造装置により精製したもの
- 2) 硝酸 : 超微量分析用
- 3) 塩化金 (Ⅲ) : 純度 98%以上

II. 装置

- 1) 純水製造装置 : 日本ミリポア製 MILLI Q SP.TOC.等
- 2) マイクロピペッター
- 3) 誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) : 島津製作所製 ICPM-8500 等

III. 器具等

- 1) 50 mL ポリプロピレン製遠沈管 (PP 遠沈管)
- 2) フィルター : ディスポーザブルシリンジフィルターユニット
(セルロースアセテート、φ25 mm×0.20 μm、アドバンテック 東洋製等)
- 3) 10 mL ディスポシリンジ : テルモシリンジ等
- 4) 10 mL PP 遠沈管 : 栄研化学製丸底スピッツ等
- 5) ピペット用のチップ
- 6) プラスチック製手袋、マスク等

IV. 試料溶液および標準溶液の調製

1. 試料溶液^{※1}

1) As、Pb および Cd

試料 49.5mL を PP 遠沈管に採り、硝酸 0.5mL^{※2} を加え、50mL とする。ただし、検体に含まれる対象物質の濃度が検量線に使用する濃度範囲の上限值を超えると予測される場合には、精製水を用いて適宜希釈を行い調製する。また、濁りがある場合はフィルターでろ過し、測定溶液とする。

2) Hg

試料 47mL を PP 遠沈管に採り、硝酸を 2.5mL、100mg/L 塩化金[文献 1]を 0.5mL 加え、50mL とする。

2. 標準溶液および内部標準溶液^{※1}

1) As、Pb および Cd

① 標準溶液（別紙参照）

As、Pb 及び Cd の各標準原液を等量ずつ混合し、それぞれ 10mg/L(ppm) になるように調製する。さらに、1~50 µg/L(ppb) となるように採り、硝酸濃度 1% となるよう硝酸を添加後、水を加えて一定量とし、これを標準溶液とする（用時調製）。

② 内部標準溶液

Ga、In 及び Tl の各標準原液を混合し、硝酸 1% になるよう硝酸を添加後、各元素濃度 50~100 µg/L 程度^{※3} の溶液を調製する。

2) Hg

① 標準溶液（別紙参照）

標準原液を段階的に希釈し、1µg/L (ppb) になるように調製する。さらに、0.1~0.4 µg/L(ppb) となるように採り、硝酸濃度 5% となるよう硝酸を添加後、さらに塩化金が 1mg/L の濃度となるように添加した後、水を加えて一定量とし、これを標準溶液とする（用時調製）。

② 内部標準溶液

Ga、In 及び Tl の各標準原液を混合し、硝酸 1% になるよう硝酸を添加後、各元素濃度 50~100 µg/L 程度^{※3} の溶液を調製する。

※1 試料溶液、標準溶液および内部標準溶液の調製は、器具からの汚染を避けるため、通常洗浄後再利用するガラス製のメスフラスコやホールピペット等の器具の代わりに、ポリプロピレン製のメスフラスコやマイクロピペット等のディスposable器具を用いて行う。

※2 酸使用時には、手袋およびマスクを着用する。手袋はプラスチック製のものが望ましい。

※3 ICP-MS 測定においてイオンカウント数が十分に得られる濃度（当所の機器においてはイオンカウント数 200kcps 以上）

V. 定性・定量

1) ICP-MS による測定

標準溶液および試料溶液を ICP-MS に導入する。内部標準溶液の導入は

ICP-MS 装置による自動添加で行う。標準溶液については、それぞれの金属および内部標準物質の質量数のイオン強度を測定し、内部標準物質に対するそれぞれの金属のイオン強度比を求め検量線を作成する。試験溶液についても、同様にそれぞれの金属のイオン強度比を求め、Ⅵの計算式より試料溶液中の金属の濃度を算出する。ICP-MS の測定条件例を以下に示す。

[ICP-MS 測定条件例]

装置：ICPM-8500
周波数：27.120 MHz
高周波出力：1.2 kW
ガス：アルゴン
 クーラントガス：12.0 L/min
 プラズマガス：1.20 L/min
 キャリアーガス：0.70 L/min
ネブライザ：同軸型ネブライザ
試料吸引量：0.55 mL/min (ADU-1 使用時 20 rpm)
チェンバ：冷却式スプレーチェンバ (2℃冷却)
ソルベントリンス：高速 60 sec、低速 30 sec
サンプルリンス：高速 60 sec、低速 60 sec
サンプリング深さ：5.0 mm
インターフェイス部：Cu 製
イオンレンズ部：ダイアゴナルレンズ
マスフィルタ部：四重極型質量分析計
測定質量数：As：75^{※4}、Pb：208、Hg：202、Cd：114 (m/z)
内部標準元素：Ga：69 (As 定量用)、Tl：205 (Pb、Hg 定量用)、
 In：115 (Cd 定量用) (m/z)
積分時間：As：3.0、Pb：2.0、Hg：8.0、Cd：2.0、他：1.0 sec
定性：質量数 (m/z)
定量：内部標準法
定量下限値：As、Cd、Pb：1.0 µg/L(ppb)、Hg：0.1 µg/L(ppb)
検量線範囲：As、Cd、Pb：1.0～50 µg/L(ppb)、Hg：0.1～0.4 µg/L(ppb)

※4 As の測定質量数 75 は、キャリアーガスのアルゴンと水に含まれる塩素イオンにより形成される $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ によりスペクトル干渉を受けるため、干渉値を質量数 77 および 82 の測定値を用いて、以下のように自動補正した。

$$\text{As 補正值} = \text{As 測定値} - \text{干渉値} = {}^{75}\text{C} - {}^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl} = {}^{75}\text{C} - 3.127({}^{77}\text{C} - 0.825 \times {}^{82}\text{C})$$

ここで、 ${}^a\text{C}$ は質量数 a における測定強度。

2) 留意事項

Hgは他3元素と比較すると、ICP-MSにおける測定濃度範囲が0～400ng/Lと低いため、イオン強度が相対的に小さい。このような場合、バックグラウンドに影響されやすく、測定の安定性が失われやすい傾向がある。また内部標準補正を行っても、正確な値が算出できない場合がある。さらには、低濃度の水銀溶液は揮発しやすい。バックグラウンドを軽減し、さらには安定したイオン強度を得るためには、①試料間の洗浄時間を長くする、②試料溶液の硝酸濃度を上げる、③積分時間を長くする、④塩化金等の揮発防止剤を添加する、といった対策が有効である。

VI. 計算式

試料中の各元素の含有量 C (mg/L, ppm) は、次式から求められる。

$$C \text{ (mg/L, ppm)} = A \text{ (}\mu\text{g/L, ppb)} \times B \div 1000$$

A：検量線から得られた試験溶液中の各元素の濃度 (μg/L, ppb)

B：希釈率

VII. 文献

- [1] <http://www.epa.gov/nerlesd1/factsheets/mpt.pdf#search='mercury%20preservation%20techniques> (accessed Oct.15.2009)

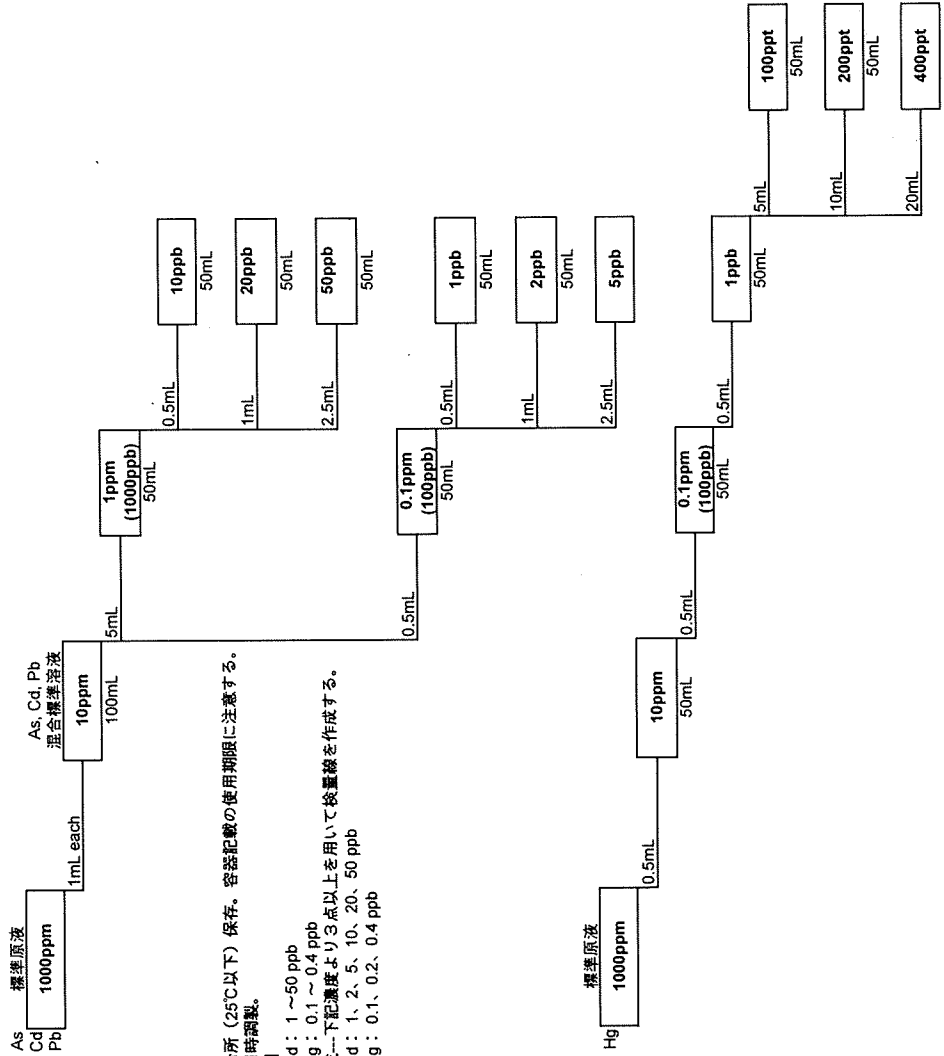
VIII. フローシート

<p><前処理></p> <p style="text-align: center;">試料</p> <p style="text-align: center;">精製水で希釈 (高濃度の場合)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>(As, Pb, Cdの場合)</p> <p>硝酸添加 0.5mL</p> <p>フィルターろ過 (濁りがある場合)</p> <p>測定溶液 (1%硝酸)</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>(Hgの場合)</p> <p>硝酸添加 2.5mL</p> <p>塩化金添加</p> <p>測定溶液 (5%硝酸)</p> </div> </div>	<p>50 mL PP遠沈管</p> <p>ピペッター、チップ</p> <p>ピペッター、チップ</p> <p>ピペッター、チップ</p> <p>メンブランフィルター ディスポシリンジ</p> <p>10 mL PP遠沈管</p>
<p><測定></p> <p>ICP-MS</p>	
<p><計算処理></p>	
<p><結果></p>	

標準溶液調製方法

以下の手順で、各濃度の混合標準溶液を調製する。

	標準原液濃度 (mg/L, ppm)	標準品管理番号	採取量(mL)	採取日	採取者	備考	廃棄日
ヒ素(As)	1,000						
鉛(Pb)	1,000						
水銀(Hg)	1,000						
カドミウム(Cd)	1,000						



- 標準原液は冷所 (25°C以下) 保存。容器記載の使用期限に注意する。
 - 標準溶液は用時調製。
 - 検量線の範囲
 - 検量線の作成より3点以上を用いて検量線を作成する。
- As、Pb、Cd : 1、2、5、10、20、50 ppb
Hg : 0.1、0.2、0.4 ppb

<参考資料>

添加回収試験

水道水および河川水（表流水）に As, Cd, Pb 50mg/L および Hg 20 mg/L となるようそれぞれ添加し、添加回収実験を行った。結果を表 1 に示した。As, Cd および Pb については、平均回収率は、水道水において 101~103%、河川水において 96.9~113%であり、変動係数は水道水では 2.1-2.9%、河川水では 1.9-2.2%という良好な結果であった。

表1. 添加回収実験結果 (n=5)

		As	Cd	Pb	Hg
水道水	回収率	101.3	101.6	102.7	122.5
	CV(%)	2.2	2.9	2.1	9.6
河川水	回収率	112.8	96.9	99.9	91.4
	CV(%)	2.1	2.2	1.9	12.3