

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品添加物の安全性確保のための研究

平成 28 年度分担研究報告書

鉛及びヒ素の同時分析法に関する研究

研究分担者 建部 千絵 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部主任研究官

研究要旨 第9版食品添加物公定書では多くの食品添加物において鉛及びヒ素の規格が設定されるが、その前処理法及び分析法は試料の性質により異なっている。本研究では鉛及びヒ素の同時分析を目的として、より簡便な前処理法として、キレート固相カートリッジ及び鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出方法について検討を行った。キレート固相カートリッジは鉛の抽出には適用可能であったがヒ素の抽出には適用できなかった。一方、鉄共沈法は試料（ナトリウム塩及びカリウム塩）中のヒ素(III)を次亜塩素酸ナトリウム溶液でヒ素(V)に酸化させ、鉄存在下で pH9 とすることで、90%以上の鉛及びヒ素が回収され、ICP による同時分析も可能であった。

#### A. 研究目的

第9版食品添加物公定書においては、海外規格との整合性をはかる目的から、一部の食品添加物を除き、鉛規格が設定されることとなり、一般試験法の鉛試験法において、前処理法の違いにより、第1法～第5法が検液の調製法として設定される。ヒ素規格についても、多くの食品添加物に設定されている。一般試験法のヒ素試験法において、前処理法の違いにより、検液の調製法に第1法～第5法が設定されており、測定は、装置Bまたは装置C（水素化物発生装置）を使用して行うこととなっており、食品添加物毎にこれらの前処理法及び測定方法が規定されている。

高マトリックス中の鉛やヒ素の分析の前処理法としては、鉛ではピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウム（APDC）溶媒抽出法

や<sup>1)</sup>、イオン交換樹脂法などの、共存元素との分離や目的元素の濃縮を行う方法が一般的に採用されており、第9版食品添加物公定書においても、ナトリウム塩等の高マトリックスを含む食品添加物中の鉛の前処理においてはAPDC溶媒抽出法が第5法として設定される。ヒ素においてはヒ素が金属イオンと沈殿しやすい性質を利用し、廃水中や土壌からヒ素を除去する方法<sup>2)</sup>や、キレート樹脂に金属塩を結合させヒ素を精製する方法<sup>3)</sup>・<sup>4)</sup>が多く報告されている。

本研究では、鉛試験法において第5法（APDC溶媒抽出法）が設定されている食品添加物(無機塩類)について、鉛及びヒ素の同時分析を目的とし、食品添加物として汎用されるナトリウム塩やカリウム塩の試料からの鉛及びヒ素のより簡便な前処理法としてキレ

ート固相カートリッジや鉄共沈法を用いた前処理法の検討及び誘導プラズマ発光分析装置 (ICP) による鉛及びヒ素の同時分析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 試薬・試液

硝酸 (超高純度試薬, Ultrapur-100), 塩酸 (超高純度試薬, Ultrapur-100) 酢酸アンモニウム溶液 (500 g/L, 鉄試験用), 25%アンモニア水 (有害金属測定用) 鉛標準液 (1000 µg/mL) は関東化学(株)製を用いた。ヒ素 (III) 標準液 (100 µg/mL), 塩化ナトリウム (特級), 塩化鉄 (III) 六水和物 (特級), 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (食品添加物用) は和光純薬工業(株)製を用いた。ひ酸[As(V)]水溶液 (NMIJ CRM, 99.53 mg/kg) は国立研究開発法人産業技術総合研究所製を用いた。塩化カリウム (特級) は片山化学製を用いた。

1 M酢酸アンモニウム溶液: 酢酸アンモニウム溶液78 mLを水で500 mLとした。

0.1 M 酢酸アンモニウム溶液: 酢酸アンモニウム溶液 4 mL を水で 250 mL とした。

0.5 M 酢酸アンモニウム溶液: 酢酸アンモニウム溶液 80 mL を水で 1000 mL とした。

鉄溶液: 塩化鉄 (III) 六水和物2.4 gを水に溶かし, 50 mLとし, その液5 mLを水で50 mLとした。

硝酸(1→100)溶液: 硝酸10 mLを水で1000 mLとした。

鉛標準原液 (100 µg/mL): 鉛標準液 (1000 µg/mL) 5 mLを硝酸 (1→100) 溶液で50 mLとし, 鉛標準原液 (100 µg/mL) とした。

Pb・As混合標準原液: 鉛標準原液 (100 µg/mL) 5 mL, ヒ素 (III) 標準液 (1000 µg/mL) 7.5 mLを硝酸(1→100)溶液で100 mLとし,

Pb・As混合標準原液とした (Pbとして5 µg/mL, Asとして7.5 µg/mL)。

Pb・As混合標準液: Pb・As混合標準原液を適宜硝酸 (1→100) 溶液で希釈し, 以下の表に示す濃度となるように, Pb・As混合標準液 1～7を調製した。

Pb・As混合標準液標準溶液 No.	濃度 (µg/mL)	
	As	Pb
1	1.5	1.0
2	0.75	0.5
3	0.6	0.4
4	0.3	0.2
5	0.15	0.1
6	0.075	0.05
7	0.0325	0.025

As (V) 標準原液: ひ酸[As(V)]水溶液約3.8 gを精密に量り, 硝酸 (1→100) 溶液で50 mLとし, As (V) 標準原液 (7.5 µg/mL) とした。

As (V) 標準液: As (V) 標準原液 (7.5 µg/mL) を適宜希釈し, As (V) 標準液 (As (V) として0.0325～1.5 µg/mL) を調製した。

### 2. 器具・装置

ダイヤフラム真空ポンプ, SPEバキュームマニホールド, 無機分析用吸引マニホールド DigiTUBE用ラック, PTFEデリバリーチップ, 1, 3, 6 mLアダプター付き25 mLリザーバー, キレート固相カートリッジ (Inert Sep ME-1, 250 mg/6 mL), エンプティーリザーバー (20 mL, フリット付) 及びDigiTubeはGLサイエンス(株)製を用いた。

高周波誘導結合プラズマ発光分光分析装置

(ICP) , SPS-3520) 日立ハイテクサイエンス(株)製を用いた。

### 3. ICP法による鉛及びヒ素の定量

試験溶液, 標準溶液及び空試験溶液につき, ICP-AES法により次の波長における発光スペクトル線の発光強度を測定した。標準溶液の発光強度より検量線を作成し, 試験溶液強度から空試験溶液吸光度を差し引いた値から, 検量線を用いて試験溶液中の鉛及びヒ素の濃度を求め, 試料中の各元素量を算出した。

元素	測定波長
As (III) , As (V)	193.76
Pb	220.353

### 4. キレート固相カートリッジによるヒ素及び鉛の抽出法の検討

#### 1) 試料液の調製

塩化ナトリウム2 gを量り, Pb・As混合標準原液0.8 mLを添加 (Asとして3 µg/g, Pbとして2 µg/g相当添加) し, 30分室温で放置した後, 硝酸 (1→100) 溶液20 mLを加え溶かし, アンモニア水でpH1~9となるように調整し試料液とした。

#### 2) キレート固相カートリッジによる鉛及びヒ素の抽出

Inert Sep ME-1を硝酸 (1→100) 溶液5 mL (流速20 mL/min) で洗浄し, 水 20 mL以上 (流速20 mL/min) でカートリッジ内に残る硝酸を洗浄した。0.1 M酢酸アンモニウム溶液5 mLを流出させ, 試料液全量を流速5 mL/minでカートリッジへ負荷した。0.5 M酢酸アンモニウム10 mL及び水10 mLで洗浄後, 硝酸 (1→100) 溶液約8 mL (流速1 mL/min) でゆっくりと溶出し, その溶出液を回収し,

硝酸 (1→100) 溶液で10 mLとし, 試験溶液とした。また, 試料を用いずに試験溶液の調製と同様に操作し, 得られた液を空試験溶液とした。

#### 3) 鉛及びヒ素の添加回収率の算出

3. ICP法による鉛及びヒ素の定量に従い, 検量線より, 試験溶液中の鉛及びヒ素の濃度を算出し, 鉛及びヒ素の添加回収率を求めた。

### 5. 鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出法の検討

#### 1) 試料液の調製

塩化ナトリウムまたは塩化カリウム2 gにPb・As混合標準原液0.8 mLを添加 (Asとして3 µg/g, Pbとして2 µg/g相当添加) し, 30分室温で放置した後, 硝酸 (1→100) 溶液20 mLを加え溶かし, アンモニア水でpH9となるように調整し試料液とした。

#### 2) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の精製

試料液に次亜塩素酸水0.2 mLを加えた後, 鉄溶液0.5 mLを加えた後, 1 M酢酸アンモニウム溶液5 mLを加え, アンモニア水でpH9に調整した後, 10分静置した。必要に応じて遠心分離 (3000 rpm, 5分間) し, 上澄液及び沈殿をストップコックを付けたフリット付エンプティリザーバーに負荷し (Fig. 1) , 沈殿のみを回収した。得られた沈殿を水10 mLで洗浄し, 洗浄液は捨てた。ストップコックを閉じ, 硝酸 (1→10) 溶液1 mLでフリット上を満たし, 5分間静置した。硝酸 (1→10) 溶液に沈殿が溶けたら, フリット上の硝酸 (1→10) 溶液を通液し, 回収した。更に, 少量の水でエンプティリザーバー及びフリットを洗浄し, 得られた洗浄液を先の回収液と

合わせ、水で10 mLとし試験溶液とした。3. ICP法によるヒ素、鉛及び鉄の定量に従い測定し、検量線より、試験溶液中の鉛及びヒ素の濃度を算出し、鉛及びヒ素の添加回収率を求めた。

### 3) pHの検討

1) 試料液の調製に従い、pHは1, 3, 5, 7及び9に調整し、試料液をそれぞれ調製した。

### 4) 次亜塩素酸ナトリウム溶液添加量の検討

1) 試料液の調製に従い試料液を調製した後、試料液に次亜塩素酸水0~2 mLを加えた後、鉄溶液0.5 mLを加えた後、1 M酢酸アンモニウム溶液5 mLを加え、アンモニア水でpH9に調整した後、10分静置した。以下2) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の精製を行い、試験溶液を調製し、3. ICP法による鉛及びヒ素の定量に従い測定し、検量線より、試験溶液中の鉛及びヒ素の濃度を算出し、鉛及びヒ素の添加回収率を求めた。

### 5) 鉄添加量の検討

1) 試料液の調製に従い調製した試料液に次亜塩素酸水0.2 mLを加え、鉄溶液0.05~2 mLを加えた後、1 M酢酸アンモニウム溶液5 mLを加え、アンモニア水でpH9に調整した後、10分静置した。以下2) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の精製に従い精製を行い、試験溶液を調製し、3. ICP法による鉛及びヒ素の定量に従い測定し、検量線より、試験溶液中の鉛及びヒ素の濃度を算出し、鉛及びヒ素の添加回収率を求めた。

## C. 研究結果及び考察

### 1. ICPによる鉛及びヒ素の同時測定

Pb・As混合標準液を用いて、ICPにより測定し検量線を作成したところ、Fig. 2に示すようにヒ素は0.075~1.5 µg/mL、鉛は0.025~1 µg/mLの範囲で $R^2 > 0.999$ の良好な直線性が得られた。本研究では第9版食品添加物公定書において、多くの食品添加物の規格に設定される、鉛及びヒ素規格値 (Pbとして2 µg/g以下、Asとして3 µg/g以下) を測定対象濃度 (最終試験溶液としてPb 0.4 µg/mL, As 0.6 µg/mL) とした場合でも、十分に測定が可能な範囲で直線性が得られることが明らかとなった。しかし、ヒ素の測定波長は紫外領域 (193.76 nm) であるため、ブランク (硝酸 (1→100) 溶液) 強度のばらつきも大きいことから、低濃度 (最終試験溶液濃度として0.075 µg/mL) 以下のヒ素を測定することは困難であると考えられた。

また、本研究ではヒ素 (III) をヒ素 (V) に酸化させることで鉄との共沈を行うこととしたため、鉄共沈法において最終試験溶液で測定する対象はヒ素 (V) となる。そこで、ヒ素 (III) とヒ素 (V) をICPで測定した場合、感度に差がみられるか、ヒ素 (V) 標準液及びヒ素 (III) を用いたPb・As混合標準液を用いてn=3で同様に検量線を作成し比較した。その結果、Fig. 3に示すようにヒ素 (V) 標準液で作成した検量線は、ヒ素 (III) を用いたPb・As混合標準液で作成した検量線とほぼ同じ傾きの検量線が得られた。以上の結果から、ICPによる分析においては、ヒ素 (III) とヒ素 (V) はほぼ同じ感度を示すことが明らかとなった。本研究では、ヒ素 (III) を用いたPb・As混合標準液を添加し検討を行ったことから、Pb・As混合標準液用いて検量線を作成し、ヒ素を定量することとした。

## 2. キレート固相カートリッジによる鉛及びヒ素の抽出法の検討

イミノジ酢酸基を持つキレート固相カートリッジは2価の重金属を捕捉し、それ以外の陽イオンは捕捉されない。Ca<sup>2+</sup>やMg<sup>2+</sup>はバッファーで洗浄することが可能である。鉛については、キレート固相カートリッジを用いて抽出が可能であり、多量の陽イオン（ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム等）を含む塩類中の重金属の抽出に有用と考えられている<sup>5)</sup>。そこで、塩化ナトリウムを用いて、キレート固相カートリッジを用いた鉛及びヒ素の抽出法の検討を行ったところ、Fig. 4に示すように、試料液のpH 5以上で、90%以上の鉛が回収され、鉛の抽出が可能であったが、ヒ素についてはいずれのpHにおいても抽出されなかった。以上の結果から、ヒ素の抽出にはキレート固相カートリッジは適さないことが明らかとなったため、塩化カリウムでの検討は行わなかった。

## 3. 鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出法の検討

### 1) pHの検討

はじめに、塩化ナトリウム2 gに鉛及びヒ素を添加（Asとして3 µg/g、Pbとして2 µg/g相当添加）し、pHを1～9に調整した試料液を用いて望月らの方法に従い<sup>6)</sup>、鉛及びヒ素の回収率を求めたところ、いずれのpHにおいても回収率が得られなかった。鉄共沈に関する梶原らの文献<sup>7)</sup>によれば、ヒ素(III)とヒ素(V)では、形態により鉄との共沈しやすさが異なることから、文献<sup>7)</sup>を参考に、次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えることで、ヒ素(III)をヒ素(V)にした後、望月らの方法に従いpHを9に調整後、鉄共沈を行った。その結果、Fig. 5に示すように、次亜塩素酸ナ

トリウム溶液を加えることで鉛及びヒ素で90%以上の回収率が得られた。そこで、試料に塩化カリウムを用い、同様に次亜塩素酸ナトリウム溶液を加え、pH1～11に調整した後、鉄共沈法を行ったところ、Fig. 6に示すように、pH9で鉛及びヒ素で90%以上の回収率が得られた。以上の結果から、試料液はpH9に調整し鉄共沈法を行うこととした。

### 2) 次亜塩素酸ナトリウム溶液添加量の検討

鉄共沈法における次亜塩素酸ナトリウム溶液量の最適化を行うため、塩化ナトリウム及び塩化カリウムに2 gに鉛及びヒ素を添加（Asとして3 µg/g、Pbとして2 µg/g相当添加）し、異なる次亜塩素酸ナトリウム溶液量（0～2000 µL）を加え、鉄共沈法を行ったところ、Fig. 7に示すように、次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えないものでは鉄の沈殿が生成せず、次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えたもの（200～800 µL）では沈殿が生成した。1000、1500及び2000 µL加えたものも同様に沈殿が見られた。得られた沈殿を精製し、鉛及びヒ素の回収率を求めたところ、Fig. 8に示すように、無添加の場合は鉛及びヒ素の回収率が10%以下であったが、200 µL以上ではいずれも80%以上の回収率が得られた。以上の結果から、次亜塩素酸ナトリウム溶液は、ヒ素(III)をヒ素(V)とし、鉄と共沈させるために添加する必要があるが、添加する量は回収率に大きな影響を与えないと考え、次亜塩素酸ナトリウム溶液の添加量は200 µLとした。

### 3) 鉄添加量の検討

鉄共沈法における次亜塩素酸ナトリウム溶液量の最適化を行うため、塩化ナトリウム及び塩化カリウム2 gに鉛及びヒ素を添加（As

として3 µg/g, Pbとして2 µg/g相当添加) し, 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (200 µL) を加え, 鉄溶液 (鉄として50~2000 µg) を加え, 鉄共沈法を行ったところ, Fig. 9に示すようにいずれの試料においてもヒ素では400 µg以上で80%以上, 鉛では200 µg以上の鉄を添加することで90%以上の回収率が得られた. 鉄の添加量を1000 µg以上に増やした場合, ICP法による測定の際, 鉄マトリックスの干渉を受けやすく, 測定値のばらつきが見られたことから, 1000 µg以下が望ましいと考えた. そこで, 塩化カリウムを試料とし, 鉄溶液を鉄として50~1000 µgの範囲で添加し, 鉛及びヒ素の回収率 (n=3) を求めたところ, Fig. 10に示すように, ヒ素は鉄200 µg以上で90%以上, 鉛は鉄100 µg以上で90%以上の回収率が得られ, 500 µg以上では回収率のばらつきが小さかった(標準偏差 < 3%). 以上の結果から, 鉄添加量は500 µgとした.

#### D. 結論

本研究により, ナトリウム塩はカリウム塩の試料に対し, 鉄共沈法では, 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (0.2 mL) を加えてヒ素 (III) をヒ素 (V) にし, 鉄溶液 (鉄として500 µg) を添加した後, 酢酸ナトリウム溶液を加え, pH9にすることで, ナトリウムやカリウムの

ような高マトリックス存在下で鉛及びヒ素が鉄と共に共沈し, 90%以上の回収率が得られることが明らかとなった. 鉄共沈法は非常に簡便で, 操作も容易であることから, 食品添加物の規格試験の簡便化につながるであろう.

#### E. 研究発表

なし

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### G. 参考文献

- 1) 日本食品化学工学会, 新・食品分析法, 光琳, pp232 (1996)
- 2) 柏木ら, 分析化学, vol.50, No.3, p187-192 (2991)
- 3) 五来ら, 分析化学, vol.51, No.9, p729-734 (2002)
- 4) Balaji et al., *Chemosphere*, 59, p1169-1174 (2005)
- 5) 建部ら, 食品化学学会第22回総会・学術大会講演要旨集, p80 (2016)
- 6) 望月ら, 第98回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集, p118 (2009)
- 7) 梶原ら, 分析化学, vol.60, No.8, p629-634 (2011)

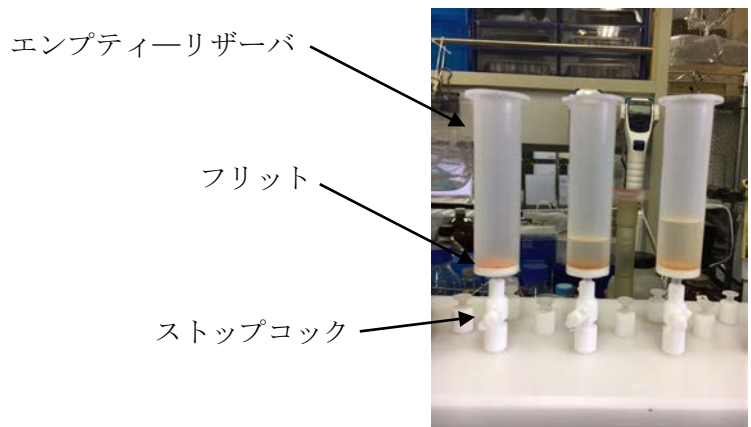


Fig. 1 鉄共沈法による鉛及びヒ素の精製

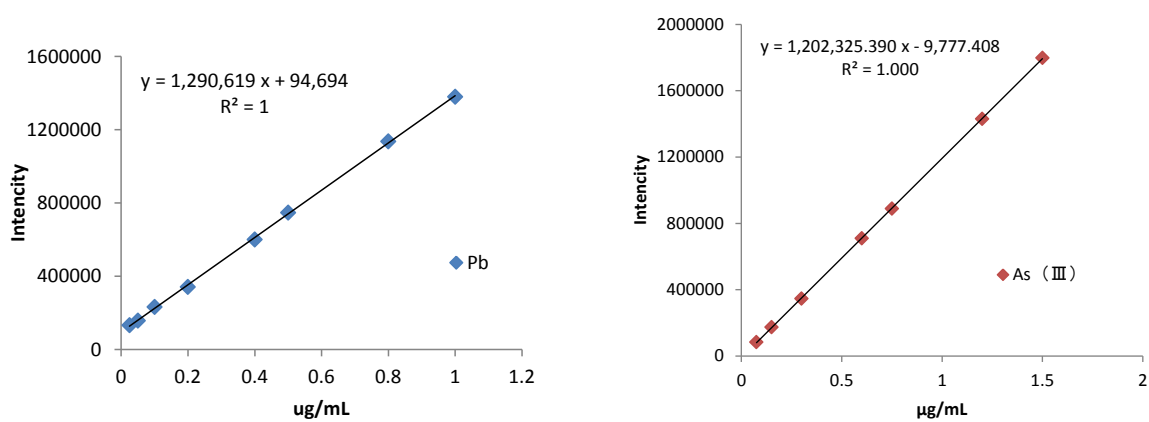


Fig. 2 ICPによる鉛及びヒ素 (III) の検量線

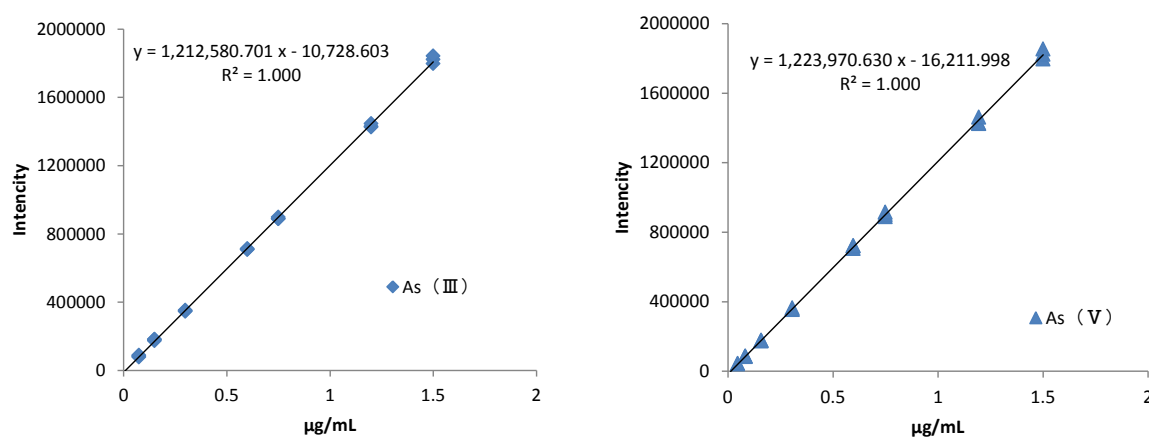


Fig. 3 ICPによるヒ素 (III) 及びヒ素 (V) の検量線

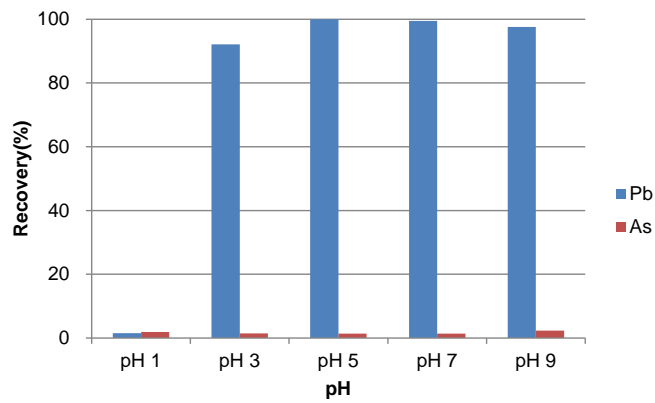


Fig. 4 キレート固相カートリッジによる塩化ナトリウムからの鉛及びヒ素の抽出に対するpHの影響

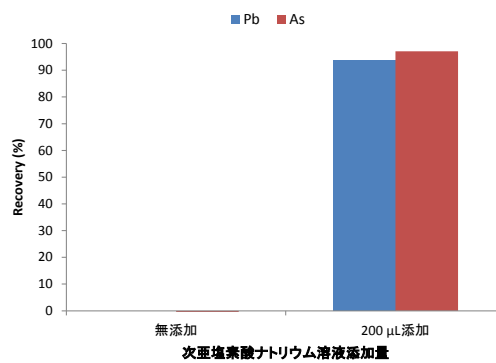


Fig. 5 pH9における鉄共沈法による塩化ナトリウムからの鉛及びヒ素の回収率への次亜塩素酸ナトリウム溶液の影響

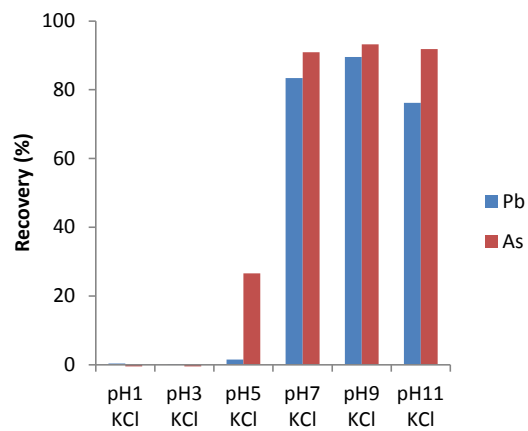
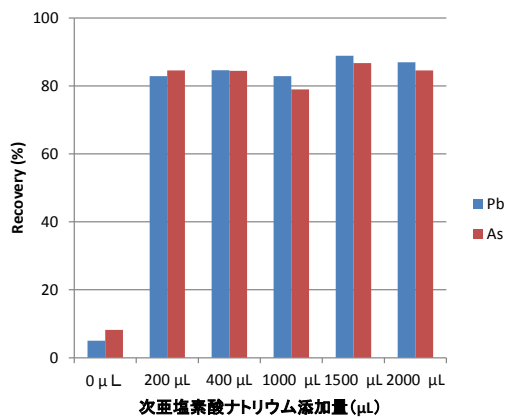


Fig. 6 鉄共沈法による塩化カリウムからの鉛及びヒ素の回収率へのpHの影響



(A)



(B)

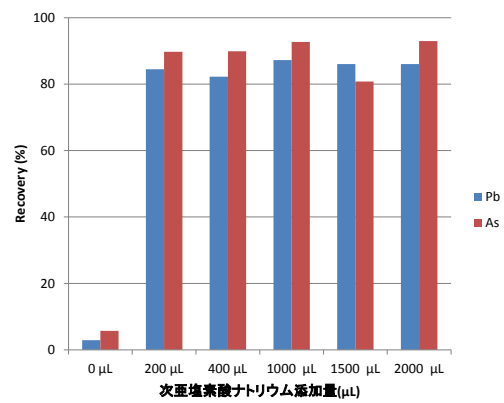


Fig. 7 鉄共沈法による塩化ナトリウム (A) 及び塩化カリウム (B) からの鉛及びヒ素の回収率へのpHの影響

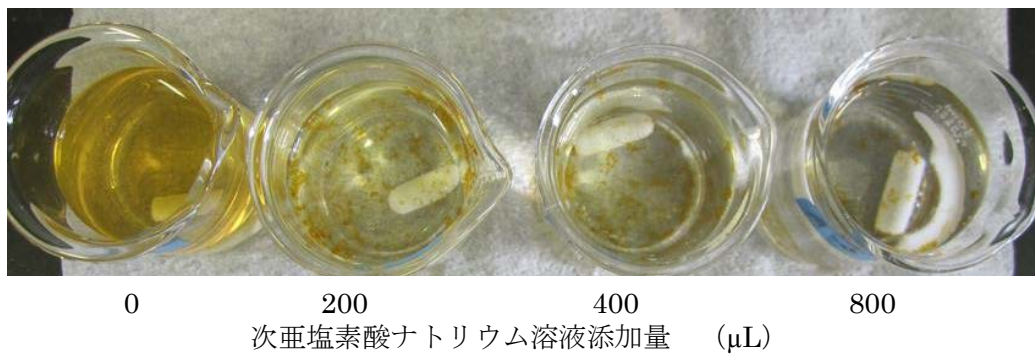
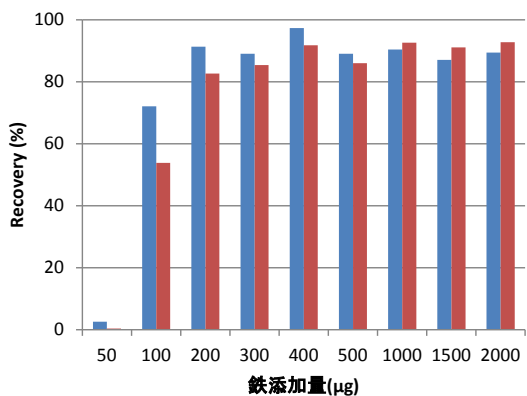


Fig. 8 鉄共沈法における次亜塩素酸ナトリウム溶液の添加量の影響

(A)



(B)

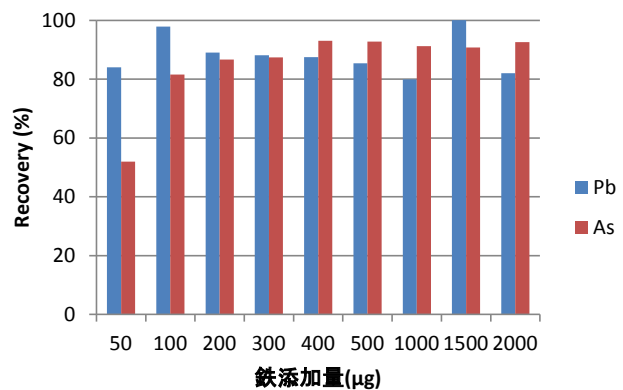


Fig. 9 鉄共沈法による塩化ナトリウム (A) 及び塩化カリウム (B) からの鉛及びヒ素の回収率への鉄添加量の影響

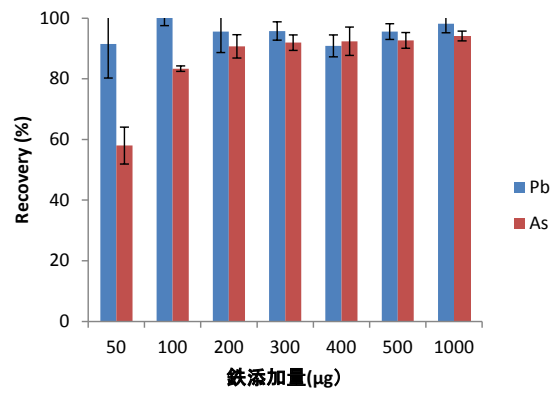


Fig. 10 鉄共沈法による塩化カリウムからの鉛及びヒ素の回収率への鉄添加量の影響