

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 食品添加物中のヒ素及び鉛の同時分析法のための前処理法として鉄共沈法を確立し、ICP-AES 法により同時分析を行った。塩化カリウムを用い、確立した方法の妥当性評価を行った。ヒ素（添加濃度 3、6 及び 12 $\mu\text{g/g}$ ）及び鉛（添加濃度 2、4 及び 8 $\mu\text{g/g}$ ）の添加回収試験を行い、回収率、併行精度 (RSD_r) 及び室内再現精度 (RSD_{ip}) を求めたところ、ヒ素では 76.0~87.2%、 RSD_r 1.5~3.2%、 RSD_{ip} 4.3~6.7%、鉛では 90.9~94.3%、 RSD_r 2.1~3.2%、 RSD_{ip} 2.1~6.5% となり、いずれの濃度でも良好な回収率が得られ、確立した鉄共沈法は真度、精度共に良好な分析法であることが明らかとなった。また、食品添加物 5 試料（塩化アンモニウム、酢酸ナトリウム、硝酸カリウム、硝酸ナトリウム及び硫酸ナトリウム）を用いて規格値相当のヒ素及び鉛を添加し添加回収試験を行ったところ、ヒ素では 79.9~83.2% RSD は 2.2~4.2%、鉛では 88.1~91.7%、 RSD は 1.6~3.6% となり、塩化カリウム以外の食品添加物にも応用が可能であると考えられた。

A. 研究目的

第9版食品添加物公定書¹⁾では、多くの食品添加物にヒ素規格が設定されており、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、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。鉛についても、海外規格との整合性をはかるため、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ている。

高マトリックス中のヒ素や鉛の分析の

前処理法としては、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¹⁾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^{2)、3)}が多く報告されている。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⁴⁾や、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では、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法として設定された。

本研究では、昨年度、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、ヒ素及び鉛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ヒ素及び鉛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)によるヒ素及び鉛の同時分析を行ってきた。その中で、ナトリウム塩やカリウム塩中のヒ素及び鉛を鉄と共沈させることにより、沈殿させたヒ素と鉛を導結合プラズマ発光分光分析法(ICP-AES法)により同時分析する方法を確立した。

今年度は、カリウム塩を用い、確立した方法の妥当性評価を行い、更に食品添加物試料を用いて確立した方法が適用可能であるか検討を行った。

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()標準液(100 µg/mL)、塩化鉄()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。塩化カリウム(特級)は片山化学工業(株)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()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。

As・Pb混合標準原液：ヒ素()標準液(100 µg/mL)7.5 mL及び鉛標準原液(100 µg/mL)5 mLを硝酸(1→100)溶液で100 mLとし、As・Pb混合標準原液とした(Asとして7.5 µg/mL、Pbとして5 µg/mL)。

As・Pb混合標準液：As・Pb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、As・Pb混合標準液1~7を調製した。

As・Pb混合標準液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	0.038	0.025

As・Pb混合溶液(As 0.3 mg/L、Pb 0.2 mg/L)：As・Pb混合標準原液2 mLを硝酸(1→100)溶液で50 mLとした。

As・Pb混合溶液(As 0.075 mg/L、Pb

0.2 mg/L):ヒ素()標準液(100 µg/mL)
を硝酸(1→100)溶液で0.75 mL及び鉛
標準原液(100 µg/mL) 2 mLを硝酸
(1→100)溶液で100 mLとした液5 mL
を、硝酸(1→100)溶液で50 mLとした。

2. 試料

塩化アンモニウム、酢酸ナトリウム、
硝酸カリウム、硝酸ナトリウム、硫酸ナ
トリウムは食品添加物用を用いた。

3. 器具・装置

ダイヤフラム真空ポンプ、SPEバキュー
ームマニホールド、無機分析用吸引マニ
ホールドDigiTUBEs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、エンブティ
ーリザーバー(20 mL、フリット付)及び
DigiTUBEsはジーエルサイエンス(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)は日立ハイテクサイエンス
(株)製のSPS-3520を用いた。

4. 鉄共沈法によるヒ素及び鉛の抽出法

1) 試料液の調製

試料2 gにAs・Pb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、室温で30分間放置した後、
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) 鉄共沈法によるヒ素及び鉛の精製

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ブティ
ーリザーバーに負荷し、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、少量の水でエンブティ
ー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。なお、
試料を用いず、試料と同様に操作した
ものを空試験溶液とした。

5. ICP-AES法によるヒ素及び鉛の定量

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
試験溶液中のヒ素及び鉛の濃度を求め、
試料中の各元素量を算出した。

元素	測定波長
As (III)	193.76
Pb	220.353

6. 鉄共沈法によるヒ素及び鉛の抽出法の妥当性評価

1) 検量線の直線性の確認

As・Pb混合標準液を用いて検量線
(n=3)を作成しそのばらつきを求めた。

2) 装置検出下限*2 (Instrument Limit of Detection: ILOD)

日本工業規格 (JIS) 発光分光分析通則 (JIS K 0116) の4.8.4 管理のための測定に従い、ブランク溶液及びAs・Pb混合溶液 (As 0.3 mg/L、Pb 0.2 mg/L) を発光強度が安定した後にそれぞれ10回連続測定を行い、ブランク溶液の測定強度の平均値 (X_b) 及び標準偏差 (S_b) 並びにAs・Pb混合溶液の測定強度の平均値 (X_1) を算出し、以下の式によりILODを求めた。

$$I = 3 \times S_b / k$$

I: ILOD

k: 検量線の傾き ($X_1 - X_b$) / C_1

C_1 : As・Pb混合溶液の濃度 (mg/L)

*2装置検出下限=検量線用ブランク溶液を連続10回測定したときに得られる信号の標準偏差の3倍の信号を与える濃度。装置検出限界ともいう。

3) 方法定量下限*3 (Method Limit of Quantification: MLOQ)

JIS発光分光分析通則 (JIS K 0116) の4.8.4 管理のための測定に従い、空試験溶液及びAs・Pb混合溶液 (As 0.075 mg/L、Pb 0.2 mg/L) を発光強度が安定した後にそれぞれ10回連続測定を行い、空試験溶液の測定強度の平均値 (X_{1b}) 及び標準偏差 (S_d) 並びにAs・Pb混合溶液の測定強度の平均値 (X_{11}) を算出し、MLOQを求めた。

$$M = 2 \times 10 \times S_d / k$$

M: MLOQ

k: 検量線の傾き ($X_{11} - X_{1b}$) / C_2

C_2 : As・Pb混合溶液の濃度 (mg/L)

*3方法定量下限 = 空試験溶液を連続 10

回測定したときに得られる信号の標準偏差の 14.1 倍の信号を与える濃度。

4) 併行精度

塩化カリウム2 gにAs・Pb混合標準原液を以下の濃度となるように添加し (n=5)、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 (n=5)。4. 鉄共沈法によるヒ素及び鉛の抽出法 2) 鉄共沈法によるヒ素及び鉛の精製により得られた試験溶液について、5. ICP-AES法によるヒ素及び鉛の定量に従い測定し、検量線より、試験溶液中のヒ素及び鉛の濃度を算出し、ヒ素及び鉛の添加回収率を求め、併行精度 (Repeatability: RSD_r) を算出した。

元素	濃度 (µg/g)		
As	1.5	3	6
Pb	1	2	4
As・Pb混合標準原液 (As 7.5、Pb 6 µg/mL) 添加量 (mL)	0.4	0.8	1.6

5) 室内再現精度

塩化カリウム2 gにAs・Pb混合標準原液を6. 鉄共沈法によるヒ素及び鉛の抽出法の妥当性評価 4) 併行精度の表の濃度となるようにそれぞれ添加し、室温で30分間放置した後、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 (n=5)。4. 鉄共沈法によるヒ素及び鉛の抽出法 2) 鉄共沈法によるヒ素及び鉛の精製により得られた試験溶液について、5. ICP-AES法によるヒ素及び鉛の定量に従い測定し、検量線より、試験溶液中のヒ素及び鉛の濃度を算出し、ヒ素及

び鉛の添加回収率を求めた。同様の操作を異なる3日間繰り返し、それぞれの回収率を求め、室内再現精度 (Intermediate Precision: RSD_{ip}) を求めた。

7. 食品添加物試料を用いた添加回収試験

食品添加物試料 (塩化アンモニウム、酢酸ナトリウム、硝酸カリウム、硝酸ナトリウム及び硫酸ナトリウム) 2 gにAs・Pb混合標準原液0.8 mLを添加 (Asとして3 $\mu\text{g/g}$ 、Pbとして2 $\mu\text{g/g}$ 相当添加) し、室温で30分放置した後、添加試料とし、4. 鉄共沈法によるヒ素及び鉛の抽出法 1) 試料液の調製及び2) 鉄共沈法によるヒ素及び鉛の精製により試験溶液を調製した。得られた試験溶液について、5. ICP-AES法によるヒ素及び鉛の定量に従い測定し、検量線より、試験溶液中のヒ素及び鉛の濃度を算出し、ヒ素及び鉛の回収率を求めた。なお、硫酸ナトリウムについては試料液の調製の際、硝酸 (1→100) 溶液20 mLを加えた後5分間加熱し、冷後アンモニア水でpH9に調整し、試料液とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、倫理面にかかわる事項はない。

C. 研究結果及び考察

1. 鉄共沈法によるヒ素及び鉛の抽出法の妥当性評価

1) 検量線

As・Pb混合標準液 (As 0.038~1.5 $\mu\text{g/mL}$ 、Pb 0.025~1.0 $\mu\text{g/mL}$) を用い

て検量線を作成 ($n=3$) したところ (Fig.1)、ヒ素では0.038~1.5 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で $R^2=0.9999$ となり良好な直線性が得られた。鉛では0.025~1.0 $\mu\text{g/mL}$ $R^2=0.9992$ となり良好な直線性が得られた。

2) ILOD

6. 鉄共沈法によるヒ素及び鉛の抽出法の妥当性評価 2) ILODに従い、ILODを求めた。その結果、ヒ素では0.0114 $\mu\text{g/mL}$ 、鉛では0.0122 $\mu\text{g/mL}$ となった。

3) MLOQ

6. 鉄共沈法によるヒ素及び鉛の抽出法の妥当性評価 3) MLOQに従い、MLOQを求めた。その結果、ヒ素では0.1084 $\mu\text{g/mL}$ 、鉛では0.0259 $\mu\text{g/mL}$ となった。

4) 併行精度及び室間再現性

6. 鉄共沈法によるヒ素及び鉛の抽出法の妥当性評価 4) 併行精度及び5) 室内再現精度に従い、回収率、併行精度 (RSD_r) 及び室内再現精度 (RSD_{ip}) をそれぞれ求めたところ、ヒ素については、Table 1に示すように添加濃度1.5、3及び6 $\mu\text{g/g}$ で平均回収率は76.0%、87.2%及び86.5%、 RSD_r はそれぞれ3.2%、1.5%及び2.1%、 RSD_{ip} はそれぞれ6.7%、4.3%及び4.3%となり、添加濃度3 $\mu\text{g/g}$ では平均回収率が70%代と低めではあったが、概ね良好な回収率、併行精度及び室内再現精度が得られた。また鉛については、Table 2に示すように添加濃度1、2及び4 $\mu\text{g/g}$ で平均回収率は92.3%、94.3%及び90.9%、 RSD_r はそれぞれ3.2%、3.1%及び2.1%、 RSD_{ip} はそれぞれ6.4%、6.5%及び2.1%となり、いずれの添加濃度でも、

90%以上の平均回収率が得られ、併行精度及び室内再現精度も良好な結果が得られ、本法は真度、精度共に良好な分析法であると考えられた。

2. 食品添加物試料を用いた添加回収試験

確立した鉄共沈法を用いて、食品添加物試料（5品目）からのヒ素及び鉛の添加回収試験を行った。その結果、いずれの試料からもヒ素では平均回収率が79.9～83.2% 相対標準偏差（RSD）は2.2～4.2%、鉛では平均回収率が88.1～91.7%、RSDは1.6～3.6%となり、今回用いた食品添加物試料からは良好な回収率が得られ、カリウム塩、ナトリウム塩以外にアンモニウム塩にも応用が可能であることが明らかとなった。また、硫酸ナトリウムについては硫酸鉛が沈殿することを考慮し、硝酸溶液を加えた後に5分間加熱した試料液を用いた場合、加熱しない場合と比較して、ヒ素及び鉛の回収率が20%程度良くなったことから、硫酸塩を試料とする場合は加熱した方が良いと考えられた。

D. 結論

本研究では鉄共沈法によるヒ素及び鉛の抽出法の妥当性評価を行い、塩化カリウムを試料とし、ヒ素（添加濃度1.5、3及び6 µg/g）及び鉛（添加濃度1、2及び4 µg/g）の添加回収試験を行い、回収率、併行精度（RSD_r）及び室内再現精度（RSD_{ip}）を求めたところ、ヒ素では平均回収率が76.0～87.2%、RSD_r 1.5～3.2%、RSD_{ip} 4.3～6.7%、鉛では平均回収率が90.9～94.3%、RSD_r 2.1～3.2%、RSD_{ip}

2.1～6.5%となり、いずれの濃度でも良好な回収率が得られ、併行精度及び室内再現精度も良好であり、確立した鉄共沈法は真度、精度共に良好な分析法であることが明らかとなった。また、食品添加物5試料（塩化アンモニウム、酢酸ナトリウム、硝酸カリウム、硝酸ナトリウム及び硫酸ナトリウム）を用いて規格値相当のヒ素及び鉛を添加し添加回収試験を行ったところ、ヒ素では平均回収率が79.9～83.2% RSDは2.2～4.2%、鉛では平均回収率が88.1～91.7%、RSDは1.6～3.6%となり、塩化カリウム以外の食品添加物にも十分応用が可能であると考えられた。以上の結果から、食品添加物公定書における一部の食品添加物を対象とした場合、ヒ素及び鉛規格試験において、簡便で精度の高いヒ素及び鉛の同時分析法として有用な方法であると考えられた。

E. 研究発表

学会発表

建部千絵，鐘熙寧，久保田浩樹，多田敦子，佐藤恭子，鉄共沈法を利用した食品添加物中の鉛及びヒ素の同時分析法の検討，日本食品衛生学会第113回学術講演会，東京都，2017年11月

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 参考文献

- 1) 柏木他：分析化学，50(3)，187-192（1991）
- 2) 五来他：分析化学，51(9)，729-734（2002）

- 3) Balaji et al., *Chemosphere*, 59, 1169-1174 (2005)
- 4) 第9版食品添加物公定書

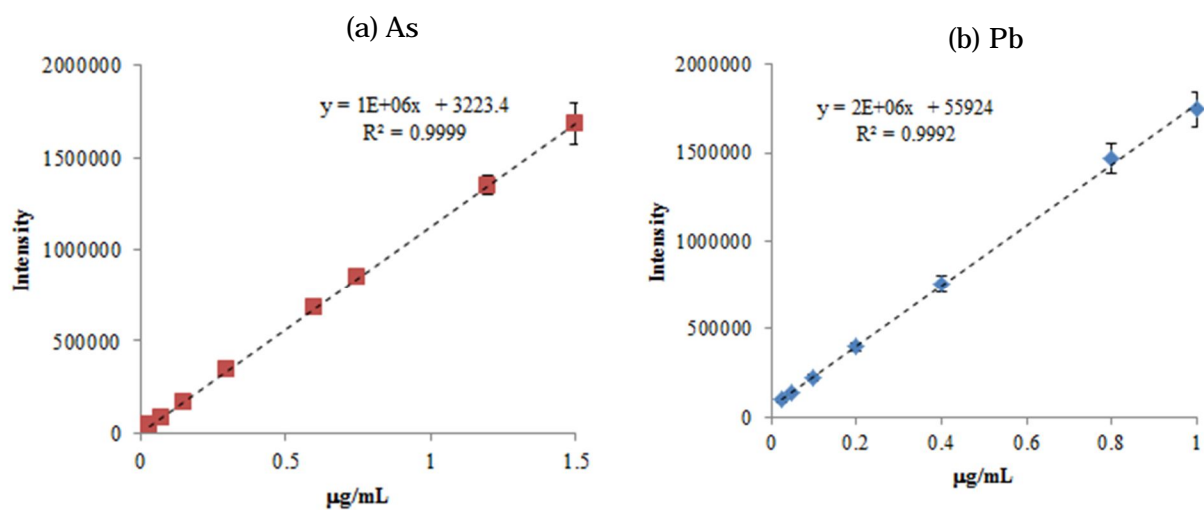


Fig. 1 ICP-AES法によるヒ素及び鉛の検量線

Table 1 鉄共沈法を用いた塩化カリウム中のヒ素抽出法を用いた添加回収試験

Spiked level (µg/g)	Recovery (%)	RSD _r (%)	RSD _{ip} (%)
3	76.0	3.2	6.7
6	87.2	1.5	4.3
12	86.5	2.1	4.3

Table 2 鉄共沈法を用いた塩化カリウム中の鉛抽出法を用いた添加回収試験

Spiked level (µg/g)	Recovery (%)	RSD _r (%)	RSD _{ip} (%)
2	92.3	3.2	6.4
4	94.3	3.1	6.5
8	90.9	2.1	2.1

Table 3 鉄共沈法を用いた食品添加物試料からのヒ素及び鉛抽出法を用いた添加回収試験

Sample		Spike level ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)	RSD (%)
Sodium acetate	As	3	80.9	3.6
	Pb	2	88.1	3.6
Potassium nitrate	As	3	82.9	2.6
	Pb	2	91.4	1.6
Sodium nitrate	As	3	79.9	2.9
	Pb	2	88.9	3.1
Ammonium chloride	As	3	82.0	4.2
	Pb	2	91.7	2.9
Sodium sulfonate	As	3	83.2	2.2
	Pb	2	91.0	2.7