

食品衛生基準科学研究費補助金(食品安全科学研究事業)
既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究
(23KA1012)

令和5~7年度 総合分担研究報告書
分析法及び試験法の開発に関する研究

環境負荷及び試験者負担の軽減を目指した分析法の検討

研究分担者 阿部 裕 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 第二室長

研究要旨

食品添加物公定書の収載された分析法及び試験法の開発に関する研究として、主に環境負荷、試験者負担を軽減することを目的とし、「エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (EDX) を用いた食品添加物中の鉛及びヒ素の定量法の検討 (EDX を用いた Pb 及び As 定量法の検討) (R5)」, 「窒素定量法の違いによる定量値及び操作性等の比較 (窒素定量法の比較) (R6)」及び「(EDX を用いた Pb 及び As スクリーニング法の検討) (R7)」の検討を行った。

EDX を用いた Pb 及び As 定量法の検討 (R5) では、ファンダメンタルパラメーター (FP) 法では感度が十分ではなかったことから、標準添加法を用いることとした。規格値相当濃度を添加した試料について、標準添加法を用いて回収率を求めたところ良好な結果が得られた。卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンにおいてわずかに回収率が低く、卵殻焼成カルシウムでは相対標準偏差も大きくなる場合があり特に試料調製において課題があることを明らかとした。

窒素定量法の比較 (R6) では、公定書に収載されている複数の窒素定量法の定量値、操作性、設備点での課題等を比較した。「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」を試料とし、定量値はいずれの分析法でも同等の結果が得られることを示した。元素分析法では、装置が高額でありキャリアガスや助燃ガスが必要ではあるが、操作は簡便で試験時間も 10 分以内で完結する点でケルダール法及びセミマイクロケルダール法より優れており、元素分析法への移行は合理的であると考えられた。

EDX を用いた Pb 及び As スクリーニング法の検討 (R7) では、対照用標準溶液との比較により、試料に添加した量が検出可能かどうか検討した。その結果、散乱線内標準補正によって精度が向上することを確認した。一方、Br の分析線と As の分析線の一部が重複してしまい、誤判定 (False Positive) となるケースがあったが、プロファイルを確認することで改善されることを確認した。また、平均原子番号が大きい試料では含量が多いものを少ないと判断してしまう場合があった。しかしいずれの場合においても、規格値の 1/2 濃度の対照用標準溶液と比較することで、Pb 及び As を規格値相当濃度含まれる試料を確実に選抜することができ、スクリーニング法として十分な精度を持つことが確認できた。

研究協力者

川末慎葉 国立医薬品食品衛生研究所

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所

中島 馨 国立医薬品食品衛生研究所

御所窪誠 (一財)日本食品分析センター

渡辺実薫 (一財)日本食品分析センター

座間俊輔 (一財)日本食品分析センター

伊藤朱美 (一財)日本食品分析センター

藤松芽生 (一財)日本食品分析センター

A. 研究目的

A-1) EDX を用いた Pb 及び As 定量法の検討

食品添加物の純度試験の項目には、酸価、塩化物、鉛 (Pb)、ヒ素 (As)、残留溶媒等がある。これらの項目のうち、Pb 及び As については、非常に多くの食品添加物に設定されている。

Pb 及び As の試験法は、試料を灰化等によって分解して検液を調製したのち、Pb は原子吸光光度計を用いて測定し、規格値相当の比較液の吸光度と比較して判定する。As の場合は、検液を調製した後、亜ヒ酸をヒ化水素として揮発させ、ヒ化水素吸収液に吸収させて発色した色を、同様に反応させた標準液の色と比較して判定する。いずれも、古くから用いられてきた方法であるが、灰化等に長時間を要する場合があったり、As の場合には有害試薬であるピリジンを用いたり、試験者や環境への負担が大きい試験法である。

試料中の原子に X 線を照射すると、原子から固有の X 線が発生し試料外に放出される (図 A1)。この放出された X 線は蛍光 X 線と呼ばれ、各元素固有の波長 (エネルギー) をもつため、蛍光 X 線分析装置 (XRF) を用いて蛍光 X 線のエネルギーを測定することで、含有されている元素が同定できる。また、その強度から物質中の各元素の量を計算することができる。多元素同時分析・非破壊分析が可能なので、様々な形態の試料の測定も可能であり、検量線を用いた定量及びファンダメンタルパラメーター (FP) 法による定量が可能である。

そこで本研究では、装置が小型かつ安価で操作が簡便なエネルギー分散型蛍光 X 線分析装

置 (EDX) を用いて、灰化等の前処理をせずに食品添加物中の Pb 及び As の定量が可能かどうか検討を行った。

A-2) 窒素定量法の比較

窒素の定量法は、B 項の一般試験法の『29. 窒素定量法』に記載されているケルダール法、セミクロケルダール法又は元素分析法のいずれかで実施することとされている。ただし、第 10 版公定書において、元素分析法を用いて窒素を定量することとされている品目はない。

窒素定量法としてケルダール法が規定されている品目のうち、Cys では、各条において規定された試料量 0.3 g の上限の試料を採取した場合 0.33 g となるが、これは窒素 38.5 mg に相当し、0.05 mol/L 硫酸で滴定すると 27.4 mL を要する計算となる。試験で規定されている 0.05 mol/L 硫酸は 25 mL であるため、試料によっては過量の硫酸が存在しない。つまり、滴定する前から滴定終点を超えていることとなる。また、CSNa についても、窒素の規格上限 (3.8%) である試料を既定の採取量 1 g 採って試験を実施した場合、これは窒素として 38 mg に相当し、0.05 mol/L 硫酸で滴定すると 27.1 mL を要する計算となる。つまり、Cys と同様に滴定前から滴定終点を超えていることとなる。このように Cys 及び CSNa においては、窒素定量が確実に実施できない場合がある。

そこで本研究では、Cys 及び CSNa の窒素定量法の改正に向けた基礎的検討として、複数の窒素定量法による測定値の比較を行うとともに、各定量法の操作性、設備面での課題、初期コスト等について比較した。

A-3) EDX を用いた Pb 及び As スクリーニング法の検討

令和 5 年度の本研究において、装置が小型かつ安価で操作が簡便なエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (EDX) を用いて、標準添加法により添加物を試料として用いた、Pb 及び As の定量法を検討した³⁾。その結果、試料調製が煩雑であること、また試料によっては適用できないことなどが示唆された。そこで本年度は、

食品添加物中のPb及びAsのスクリーニング法への適用が可能かどうか検証した。

B. 研究方法

B-1) EDXを用いたPb及びAs定量法の検討

B-1-1) 試料

ケイソウ土（当部管理番号：C2308）、卵殻焼成カルシウム（当部管理番号：C2342）、L-アルギニン（当部管理番号：C2256）：一般社団法人日本食品添加物協会（日添協）を通じて入手した市場流通品を用いた。それぞれPb及びAsの規格値とともに表A1に示した。

B-1-2) 標準原液及び試薬

Pb 標準原液：Lead Standard for ICP，濃度：1000 mg/L $\pm$ 3 mg/L，SIGMA-ALDRICH 社製（CN：41318，Lot：BCCD0986）

As 標準原液：Arsenic Standard for ICP，濃度：1000 mg/L $\pm$ 2 mg/L，SIGMA-ALDRICH 社製（CN：01969，Lot：BCCC2631）

水：ピューリックΩ（オルガノ株式会社製）で製造した超純水

B-1-3) 添加用標準液の調製

① ケイソウ土用 Pb 標準原液 0.8 mL 及び As 標準原液 0.6 mL に水を加え 2 mL とした（Pb：400 μ g/mL，As：300 μ g/mL）。

② 卵殻焼成カルシウム用 Pb 標準原液 0.32 mL 及び As 標準原液 0.48 mL に水を加え 2 mL とした（Pb：160 μ g/mL，As：240 μ g/mL）。

③ L-アルギニン用 Pb 標準原液 0.12 mL 及び As 標準原液 0.18 mL に水を加え 1 mL とした（Pb：120 μ g/mL，As：180 μ g/mL）。

B-1-4) 添加試料の調製

① ケイソウ土

ケイソウ土 32.0 g を 250 mL 容ポリプロピレン（PP）製容器にとり，Pb 標準原液 0.32 mL 及び As 標準原液 0.24 mL を加え，均一になるように良く振り混ぜた。水分をのぞくため，ドラフト内で蓋を開けた状態で 40℃で 4 時間乾燥し添加試料とした。添加試料中の Pb 及び As 濃度はそれぞれ 10 及び 7.5 μ g/g となる。

② 卵殻焼成カルシウム

卵殻焼成カルシウム 65.0 g をメノウ乳鉢にとり，Pb 標準原液 0.195 mL 及び As 標準原液 0.13 mL を加え，均一になるようにすり混ぜたのち，250 mL 容 PP 製容器に移し，さらに良く振り混ぜた。水分をのぞくため，ドラフト内で蓋を開けた状態で 40℃で 4 時間乾燥したものを添加試料とした。添加試料中の Pb 及び As 濃度はそれぞれ 2 及び 3 μ g/g となる。

③ L-アルギニン

L-アルギニン 18.0 g をメノウ乳鉢にとり，Pb 標準原液 0.036 mL 及び As 標準原液 0.054 mL を加え，均一になるようにすり混ぜたのち，100 mL 容 PP 製容器に移し，さらに良く振り混ぜた。水分をのぞくため，ドラフト内で蓋を開けた状態で 40℃で 4 時間乾燥したものを添加試料とした。添加試料中の Pb 及び As 濃度はそれぞれ 2 及び 3 μ g/g となる。

B-1-5) 測定試料及び測定添加試料の調製

試料（ケイソウ土は 2.0 g，卵殻焼成カルシウムは 4.0 g，L-アルギニンは 3.0 g）を 50 mL 容 PP 製容器にとり，それぞれ添加用標準溶液 0，0.025，0.05，0.075 及び 0.10 mL を加え，ケイソウ土はそのまま振り混ぜ，卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンはメノウ乳鉢ですり混ぜたのち容器に戻しよく振り混ぜた。水分を除くため，ドラフト内で蓋を開けた状態で 40℃で 4 時間乾燥したものを測定試料とした。また，添加試料について同様の操作を行ったものを，測定添加試料とした。

B-1-6) 装置

EDX：EDX-8100（ターレット付き）（島津製作所製）

B-1-7) 測定試料及び測定添加試料の測定

サンプルカップ（P/N 219-85000-55，島津製作所製）の底部に PP 製フィルム（P/N 219-82019-05，島津製作所製）を張り，その上に測定試料又は測定添加試料を厚さ 0.5 cm 以上（ケイソウ土は 2.0 g，卵殻焼成カルシウムは 4.0 g，L-アルギニンは 3.0 g）入れ，サンプル瓶など

を使って強く表面を押し詰め、上部には真空測定用 PP フィルム (CAT.No.325, Chemplex 製) を張った。測定試料、測定添加試料ともに各濃度 3 個ずつ調製し、次に示す測定条件で測定した。ただし、L-アルギニンについては、検討途中で試料が不足したため、測定試料、測定添加試料とも各濃度 1 個ずつ調製した。

B-1-8) 測定条件

測定元素：As (K_{β} 線), Pb ($L_{\beta 1}$ 線)

分析グループ：定量

検出器：シリコンドリフト検出器 (Silicon-drift detector, SDD)

X 線管球：Rh ターゲット

管電圧：50 [kV]

管電流：100 [μ A]

コリメータ：10 [mm ϕ]

スピン：しない

1 次フィルタ^{脚注 1}：#4

雰囲気：大気

積分時間：1800 [秒]

デッドタイム：最大 30 [%]

B-1-9) 回収率の算出

測定試料及び測定添加試料におけるそれぞれの添加濃度と面積値から関係線を作成し、試料及び添加試料中の Pb 及び As 濃度を求めたのち、回収率を算出した。

なお、装置付属のソフトウェアでの計算結果では計算過程が不透明であったため、測定により得られた面積値を Microsoft Excel を用いて関係線を作成して計算し、以下の式から回収率を求めた。

回収率 (%) = {(測定添加試料の濃度) - 測定試料の濃度 (ただし試行回数が 3 の場合は平均値)} $\div$ 添加濃度 $\times$ 100

B-2) 窒素定量法の比較

B-2-1) 試料

Cys は一般社団法人日本食品添加物協会(日添協)を通じて入手した市場流通品を用いた。また、CSNa については日添協を通じても入手

できなかったため、市販の試薬(特級、関東化学(株)製)を用いた。

B-2-2) 試薬及び標準品

① 試薬

硫酸：特級

二酸化セレン：和光特級

水酸化ナトリウム：特級

0.05mol/L 硫酸：容量分析用

以上、富士フィルム和光純薬(株)製

② 標準品

エチレンジアミン四酢酸(EDTA)：認証標準物質、LECO ジャパン合同会社製

アセトアニリド：有機元素分析用、キシダ化学(株)製

B-2-3) 定量

① 公定法(ケルダール法)

操作は公定書にしたがった。すなわち、Cys は乾燥せず、CSNa は 105℃で 4 時間乾燥したもの試料とし、既定の量(Cys : 0.3 g, CSNa : 1 g)を精密にケルダールフラスコに量り採り、硫酸カリウム 5 g, 硫酸銅(II)五水和物 0.5g を加えた。ただし、Cys の場合はさらに二酸化セレン 0.2 g を加えた。これに硫酸 20 mL を加え、泡立ちがほとんど止むまで穏やかに加熱し、更に温度を上げて沸騰させ、内容物が青色の透明な液となった後、更に 1~2 時間加熱した(Cys の場合は 4 時間)。冷後、水 150mL を徐々に加え、冷却した。冷後、沸騰石又は粒状の亜鉛 1~3 粒を加え、ケルダール分解装置を組み立てた(図 B 1)。H に 0.05 mol/L 硫酸 25 mL を正確に量って入れ、更に水約 50 mL を加え、G の下端をこの液中に浸し、次に、C から水酸化ナトリウム溶液(1→5)85 mL を徐々に加え、更に少量の水で洗い込み、D の部分のピンチコックを閉じ、A を軽く揺り動かして内容物を混和した後、穏やかに加熱し、沸騰し始めたならば加熱を強めて、内容物の約 2/3 容量が留出するまで蒸留した。次に、G の下端を H の液面から離し、更にしばらく蒸留を続けた後、G の下端を少量の水で洗い込み、H の液中の過量の

硫酸を 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で滴定した。終点の確認には、電位差計又は指示薬(ブロモクレゾールグリーン・メチルレッド混合試液 3 滴)を用いた。別に空試験を行い、補正した。なお、全ての操作を 3 回繰り返した(n=3)。

② 公定法改法(ケルダール法)

公定法から試料量を減らした方法を公定法改法とした。試料量は、Cys は 0.2 g, CSNa は 0.8 g とした。その他は全て① ケルダール法と同様に操作した。

③ セミマイクロケルダール法

1)装置

加熱分解装置：DigiPREP HT250-20(株式会社 SCP SCIENCE 製)(図 B 2)

自動蒸留滴定装置：VAPODEST 500(ゲルハルトジャパン株式会社製)(図 B 3)

2)測定条件

水添加量：50 mL

30%水酸化ナトリウム溶液量：30 mL

2%ほう酸溶液量：80 mL

蒸留時間：5 min

3)定量

第 18 改正日本薬局方³⁾又は医薬部外品原料規格 2021⁴⁾にしたがった。すなわち、Cys は 105℃3 時間、CSNa は 105℃で 4 時間乾燥したものの試料とし、既定の量(Cys : 30 mg, CSNa : 0.1 g)を精密に分解容器に量り採り、分解促進剤 1 g を加えた。これに硫酸 7 mL を加えた後、過酸化水素(30) 1 mL を分解容器を揺り動かしながら徐々に加えたのち、加熱分解装置で分解した。なお分解温度は 380℃、分解時間は 4 時間とした。冷後、水 20 mL を注意しながら加えて冷却し、自動蒸留滴定装置で蒸留滴定を行った(滴定液：0.005 mol/L 硫酸)。別に空試験を行い、補正した。なお、全ての操作を 3 回繰り返した(n=3)。

④ 元素分析法(改良デュマ法)

1)装置

元素分析装置：SUMIGRAPH NC-

TRINITY(株式会社住友分析センター製)(図 B 4)

2)測定条件

燃焼管温度：900℃

還元管温度：600℃

熱伝導度検出器温度：100℃

カラム温度：70℃

キャリアガス：高純度ヘリウムガス(純度 99.995 %以上)

キャリアガス流量：80 mL±5 mL/min

助燃ガス：高純度酸素ガス(純度 99.99 %以上)

3)定量

試料(Cys : 0.5 及び 0.25 g, CSNa : 0.5 g)及び EDTA 標準品をそれぞれ石英ボードに精密に量りとり装置に導入し測定した。検量線範囲は想定される範囲として窒素量が 10~64 mg に相当する濃度とした。得られた EDTA 標準品のピーク面積から検量線を作成し、各試料のピーク面積値から窒素量を求めた。なお、全ての操作を 3 回繰り返した(n=3)。

⑤ 元素分析法(CHN コーダー法)

1)装置

有機微量元素分析装置：vario EL cube(エレメント・ジャパン株式会社製)(図 B 5)

2)測定条件

燃焼管温度：950℃

還元管温度：550℃

キャリアガス：ヘリウム

キャリアガス流量：230 mL/min

助燃ガス：酸素

3)定量

試料(Cys 及び CSNa : 2 mg)及びアセトアニリド標準品をそれぞれアルミボードに精密に量りとり装置に導入し測定した。検量線範囲は想定される範囲として窒素量が約 0.1~0.3 mg に相当する濃度とした。得られたアセトアニリド標準品のピーク面積から検量線を作成し、各試料のピーク面積値から窒素量を求めた。なお、全ての操作を 3 回繰り返した(n=3)。

B-3) EDX を用いた Pb 及び As スクリーニング

法の検討

B-3-1) 試薬及び標準原液

① 試薬

水：ピューリック Ω（オルガノ株式会社製）で製造した超純水

セルロース粉末：MP Biomedicals 社製（CN：191499, Lot：YD01017）<22400031>

L-アルギニン：Caca（CN：58050-17, 食品添加物グレード, Lot：602K1408）<22400037>

② 標準原液

Pb 標準原液：Lead Standard for ICP, 1000 mg/L, SIGMA-ALDRICH 製（CN：41318, Lot：BCCD0986）<32200739>

As 標準原液：Arsenic Standard for ICP, 1000 mg/L, SIGMA-ALDRICH 製（CN：01969, Lot：BCCC2631）<32100283>

ただし、<>は当部管理番号を示す。

B-3-2) 試料

本研究に用いた添加物試料を Pb 及び As の規格値、添加試料調製法、平均原子番号、主成分とともに表 C 1 に示した。なお、試料は平均原子番号順とした。これらは一般社団法人日本食品添加物協会（日添協）を通じて市場流通品を入手した。なお、「卵殻焼成カルシウム」以外は Pb 及び As の含量が規格値以下であることが確認されたものを用いた。

B-3-3) 装置・器具

① 装置

EDX 装置 EDX-8100（ターレット付き）
（株）島津製作所製）

② 器具

EDX 試料容器、一般用フタなし P/N 219-85000-55（島津製作所製）、容量 10mL

ポリプロピレン（PP）フィルム P/N 219-82019-05（島津製作所製）、厚さ 5μm

マイクロポラスフィルム CAT.No.325（Chemplex 社製）、気孔率 5 %

メノウ乳鉢・乳棒 SBU-110（外径 110×内径 90×深さ 40）（野中理化）

B-3-4) 対照用標準溶液

Pb 標準原液及び As 標準原液を混合し、以下の濃度になるように水で希釈した。

① Pb・As：1.0 μg/mL・1.5 μg/mL

② 2.0 μg/mL・3.0 μg/mL

③ 3.0 μg/mL・4.5 μg/mL

④ 4.0 μg/mL・6.0 μg/mL

B-3-5) 添加試料の調製

(1) 溶液を添加する場合

試料を PP 製遠沈管に量りとり、目標濃度となるようできるだけ少量の PbAs 混合標準液を加えた。本研究で用いた試料の Pb と As の規格値はほぼ全てがそれぞれ 2 及び 3 μg/g であったことから、目標濃度は Pb・As が 1・1.5 μg/g（0.5 倍）、2・3（1 倍）、2.4・3.6 μg/g（1.2 倍）又は 3・4.5 μg/g（1.5 倍）とした。ただし、L-アルギニンと「卵殻焼成カルシウム」は、Pb・As が 1・1.5 μg/g（0.5 倍）、2・3（1 倍）、3・4.5 μg/g（1.5 倍）又は 4・6 μg/g（2.0 倍）とした。例えば、試料量が 6g 必要な場合は、試料 6g に PbAs 混合標準液（Pb:100 μg/mL・As：150 μg/mL）を 0.06, 0.144, 0.18 μL を加えた。その後、ドラフト内で蓋を開けた状態で 40℃（As が揮散する可能性を考慮し 40℃とした）で約 4 時間乾燥して水分を除いたのち、メノウ製乳鉢を用いてすり潰しながら混ぜ、均一化した。

(2) 標準粉末を添加する場合（カロブベーンガム及びグァーガム）

標準粉末は、セルロース粉末 3g を PP 製遠沈管に量りとり、Pb 及び As 標準原液（各 1000 μg/mL）を Pb 0.18 mL, As 0.27 mL 添加したのち、40℃で約 4 時間加温し水分を飛ばした。メノウ乳鉢ですり混ぜて均一化し、標準粉末（Pb：60, As：90 μg/g）を調製した。

添加試料の調製は、対象とする試料を PP 製遠沈管に量りとり、その量を 95%相当とし、それに対して標準粉末とセルロース粉末を合わせて 5%相当になるように加えて、メノウ乳鉢で均一化した。例えば、試料量が 6g 必要な場合は、試料 5.7g に PbAs 標準粉末（Pb：60, As：90 μg/g）とセルロース粉末を、

(0.1g+0.2g), (0.24g+0.06g), (0.3g+0g) 加え、0.5 倍、1.2 倍、1.5 倍の添加試料を調製した。

B-3-6) 測定サンプルの調製

(1) 溶液の試料を測定する場合

PP フィルムを張った EDX 試料容器に試料を 8mL いれ、蒸発防止のため上部も PP フィルムを張った。

(2) 粉末の試料を測定する場合

EDX 試料容器の底部に PP フィルムを張り、その上に試料を入れ、タッピングにより表面を押し詰め、厚さ 1cm 程度に詰めた。上部には飛散防止のためマイクロポラスフィルムを張った。

B-3-7) EDX 測定条件

測定条件は表 C 2 にまとめた。なお、散乱線内標準補正をするかしないかは、解析時に選択した。

C. 結果及び考察

C-1) EDX を用いた Pb 及び As 定量法の検討

C-1-1) 定量方法の選択

XRF を用いて鉱物や合金等、無機物で構成されている試料中の構成元素の定量には、物理定数（ファンダメンタルパラメーター，FP）を用いた FP 法が汎用される。FP 法は、標準試料を必要としない XRF 独自の定量法で、試料の蛍光 X 線強度から試料組成を理論的に推定し、検出された全ての元素の合計量が 100% となるように計算することで試料中の各元素の含量を算出する。いずれの装置メーカーの XRF にも標準的に備わっている定量法である。そこで予備検討として、ケイソウ土に規格値相当の Pb (10 µg/g) と As (7.5 µg/g) を添加した添加試料を調製し、FP 法で定量した^{脚注 2}。測定は大気条件と真空条件で、それぞれ 3 試行で行った。その結果、Pb は PbO としていずれの測定条件においても 0.002% (=20 µg/g) 検出され、As は大気条件で 0.002%、真空条件では不検出となった。Pb も As も FP 法では感度が不十分で正確な定量値が得られなかったと考えられた。

そこで、検量線を用いる方法を検討した。XRF で検量線を用いて定量するには、未知試料と主成分、および定量対象元素の含有範囲を合わせた濃度既知の標準試料を用意する必要がある。適切な標準試料が得られない場合は、標準試料（例えば水溶液）と未知試料（例えば固体）の主成分の違いを補正する内標準法、あるいは標準添加法による関係線から定量することができるが、本研究では標準添加法による定量法を検討した。

また、EDX の測定条件として大気条件と真空条件があるが、特別な試料調製や装置機能が不要な大気条件で行うこととした。

C-1-2) 試料の選択

食品添加物の性状は、液体、ペースト、固体、粉末等様々であるが、本年度は装置感度及び試料調製のし易さの観点から、固体、特に粉末の試料を対象とすることとした。なお、粉末の試料には、主成分が無機物か有機物かの違いがあり、また Pb 及び As の規格値にも幅が見られた。そこで、Pb 及び As の規格値も考慮し、主成分が無機物のものとしてケイソウ土及び卵殻焼成カルシウム、主成分が有機物のとして L-アルギニンを試料として用いた（表 A 1）。

C-1-3) 添加回収試験

① 添加試料の調製

添加試料における Pb 及び As の濃度は各品目の規格値相当濃度とした。本研究では、試料は粉末のものを対象としたが、溶液を添加することで溶解又は吸湿して硬化する可能性があったため、添加量は極力少なくした。また、試料中の水分の影響を抑えるため、添加後の試料は良く攪はんして混ぜ合わせたのち乾燥させることとした。ただし、高温で乾燥すると As が揮散する可能性があったため、40℃で 4 時間穏やかに加温することで乾燥した。

② 測定試料及び測定添加試料の調製

標準添加法における測定試料や測定添加試料の調製では、試料に濃度が異なる標準溶液を一定量添加するか、一つの濃度の標準溶液

を設定された濃度になるように量を変えて添加する方法があるが、標準溶液調製の手間を考慮し、本研究では一つの濃度の標準溶液を量を変えて添加することとした。また、① 添加試料の調製と同様に、標準溶液の添加量は極力少なくし、添加して良く攪はんした後、40℃で4時間穏やかに乾燥したものを測定試料又は測定添加試料とした。

測定試料及び測定添加試料に添加する Pb 及び As 濃度は、規格値相当濃度の 1/2～2 倍の範囲とした。

③ 回収率

ケイソウ土、卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンのそれぞれについて、測定試料及び測定添加試料の関係線の一例を図 A 2-1～3 に、含有量及び回収率を表 A 2 に示した。

ケイソウ土では、測定試料及び測定添加試料のいずれにおいても、関係線の決定係数 (R^2) は 0.994 以上となり、良好な直線性を示した (図 A 2-1)。また、回収率は Pb で 97.6%、As で 98.1%、相対標準偏差 (RSD) もそれぞれ 2.4 及び 4.6% であり、非常に良好な結果であった (表 A 2)。

卵殻焼成カルシウムでは、関係線の決定係数は 0.90 以上となった。一部の濃度点における繰り返し精度が悪かったが、直線性は認められた (図 A 2-2)。回収率は、Pb が 84.5%、As が 75.9%、RSD はそれぞれ 17.6% 及び 5.9% であった (表 A 2)。

L-アルギニンでは、関係線の決定係数は 0.992 以上と良好な直線性を示した (図 A 2-3)。また回収率は Pb で 88.0%、As は 85.8% と良好であった (表 A 2)。

以上のように、おおむね良好な結果が得られたが、卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンの回収率はケイソウ土に比べると低い値であり、特に卵殻焼成カルシウムでは繰り返しの相対標準偏差も大きい値であった。これは、卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンの規格値がケイソウ土に比べ低いことが原因の一つと考えられた。また、L-アルギニンは水に溶けるため、添加試料及び測定試料を調製する際に溶解したために均一に混ぜ合わせること

が出来なかった可能性もあった。卵殻焼成カルシウムの主成分は酸化カルシウム (CaO) であるが、CaO は水と反応し発熱して水酸化カルシウムになり固まるため、それも均一に混ぜ合わせることができなかった原因の一つと推定された。

④ ケイソウ土の Pb 及び As 純度試験との比較

ケイソウ土の測定試料の定量結果において、Pb が 10.6 $\mu\text{g/g}$ 、As が 8.4 $\mu\text{g/g}$ と公定書における規格値 (Pb : 10 $\mu\text{g/g}$ 、As : 7.5 $\mu\text{g/g}$) をわずかに上回った。そこで、公定書に準じて Pb 及び As の純度試験を行ったところ、Pb は 0.4 $\mu\text{g/g}$ 、As は 1.2 $\mu\text{g/g}$ (いずれも $n=3$) となり、Pb は規格値の 1/20 未満、As は 1/5 未満であり、規格基準に適合していることが確認された。

公定書におけるケイソウ土の Pb 及び As の試験法は、塩酸酸性下及び高温下で抽出されたものを測定している。これは、食品製造中に食品に移行する可能性があることを考慮して、過剰な試験条件が設定されたものであるが³⁾、実際の含量は適切に定量できないことが示唆された。

C-2) 窒素定量法の比較

C-2-1) 各定量法の定量値の比較

C-2-1-1) Cys

各定量法における結果を表 B 1 及び図 B 6 に示した。また、④ 改良デュマ法及び⑤ CHN コーダー法の検量線を図 B 7 に示した。いずれの検量線も測定した範囲において良好な直線性 ($r>0.9999$) であった。ただし、Cys においては、④ 改良デュマ法において試料中の窒素量が今回設計した検量線範囲の上限値付近となったことから試料量を半分の 0.25 g とした結果も④' として示した。

定量値の平均値 ($n=3$) は 98.7～99.4% であった。公定法とその他の定量法の定量値の比 (その他の定量法/公定法) は 0.99～1.00 であった。また、相対標準偏差は 0.07～0.55% であった。以上の結果から、いずれの定量法においてもほぼ同程度の定量値が得られること、かついずれの定量法においても精度よく測定可能であることが確認された。

C-1-2) CSNa

CSNaは吸湿性があり、⑤CHNコーダー法における採取量 2 mg は極めて微量なため正確な秤量が困難であった。そのため、CSNa では⑤CHN コーダー法は検討から除外した。⑤CHN コーダー法以外の定量法における結果を表 B 2 及び図 B 8 に示した。

定量値の平均値(n=3)は 3.08～3.19%，公定法とその他の定量法の定量値の比(その他の定量法／公定法)は 0.98～1.02，相対標準偏差は 0.21～2.27%であった。以上の結果から、CSNa においても、いずれの定量法でも得られる定量値はほぼ同じであること、かついずれの定量法においても精度よく測定可能であることが確認された。

C-2-2) 各定量法の特徴

C-2-2-1) ケルダール法及びセミマイクロケルダール法

ケルダール法の操作は以下の通りである。また、公定書に示されているケルダール法及びセミマイクロケルダール法で用いる装置をそれぞれ図 B 1 ～図 B 3 に示した。

- ① 試料に硫酸を加え分解促進剤存在下で加熱分解して窒素を硫酸アンモニウムに変換する。
- ② 水酸化ナトリウムを加えてアルカリ性としたのち、水蒸気蒸留によってアンモニアを遊離させ硫酸に捕集し、再び硫酸アンモニウムとする。
- ③ 過量の硫酸を水酸化ナトリウムで滴定し、②において消費された硫酸の量を求める。(逆滴定)
- ④ 消費された硫酸の量から計算式により窒素の量を求める。

なお、セミマイクロケルダール法の操作もケルダール法とほぼ同様であるが、公定書においては、試料量はケルダール法の 1/10 とされ、遊離したアンモニアの捕集はホウ酸溶液を用い、ホウ酸溶液中に遊離したアンモニアを硫酸で滴定する点で異なる。なお、一部の操作は自動化された装置を用いることもできる。

試薬として劇物である硫酸や水酸化ナトリウムを使用するうえ、「L-シスチン」では分解促進剤に毒物である二酸化セレンを使用する。

分析時間は、ケルダール法及びセミマイクロケルダール法ともに試料の分解に約 4 時間、蒸留から測定までの操作にケルダール法は約 45 分間、セミマイクロケルダール法は約 7 分間程度かかる。また、自動化されていない装置を用いる場合は、大部分の操作において試験者が現場に立ち会う必要があるため、試験者への負担が大きい。

基本的に特別な機器は不要であり、試験に用いる装置はいずれもガラス器具で構成されそれぞれはそれほど高価なものではない。しかし、複数試料を同時に加熱できるような装置もあり(図 B 9)、十数万円程度かかる。また、セミマイクロケルダール法では加熱分解装置(図 B 2)や自動蒸留滴定装置(図 B 3)を使用することができるが、それぞれ数十万～百数十万円程度かかる。

また試料の分解時に亜硫酸ガスが発生するためドラフト設備が必須となり、大量の硫酸廃液に加え、硫酸銅を使用するため重金属廃液の処理が必要となる。したがって、環境負荷が大きい試験法であるとも言える。

C-2-2-2) 元素分析法

元素分析法は、いわゆる燃焼法と呼ばれ、元素分析計を用いる。窒素の場合、採取した試料を高温で完全燃焼し窒素酸化物(NO_x)を発生させ、還元管を通過して窒素に還元したのち、水分と二酸化炭素を除去し熱伝導度検出器(Thermal Conductivity Detector, TCD)や非分散赤外線吸収法(Non-Dispersive Infrared Absorption, NDIA)等によって検出する。適切な標準品を用いて検量線を作成し定量することができる。大部分の操作は自動化されているため、煩雑な操作はない。装置としては、窒素以外にも炭素、水素、硫黄、酸素等の定量も可能なものなど、様々なメーカーから多種の装置が市販されているが、いずれも数百万～一千数百万円程度と非常に高価である(図 B 4 及び図 B 5)。

分析時間は操作全体では 10 分以内で完了するため非常に迅速である。特別な試薬は使用しないが、キャリアガスとしてヘリウム又はアルゴン、助燃ガスとして酸素を必要とする。そのためこれらのガスを供給可能な設備又はガスボンベの設置が必要となる。

得られた結果は滴定のように目視での判定を行わないため試験者による差が生じない。

C-2-2-3) 各定量法の特徴の比較

各定量法の特徴を表 B3 にまとめた。ケルダール法は分析に長時間を要し、また試験者や環境への負荷が大きいことが改めて示された。一方元素分析法においては、装置が高価であり初期投資が大きいというデメリットがあったが、測定時間や操作性は明らかに迅速で簡便であり、試験者や環境負担の小さい分析法であると考えられた。

C-3) EDX を用いた Pb 及び As スクリーニング法の検討

C-3-1) 添加試料の調製法の検討

添加試料の調製は操作が簡便な溶液を添加する方法検討した。

試料に少量の混合標準液を添加し、40℃で約 4 時間乾燥させた。その結果、ほとんどの試料は図 C1 の「L-ロイシン」のようになり、標準液を滴下した部分は乳棒で触れるだけで簡単に崩れるような状態であり、その後の操作も容易であった。一方、多糖類である「グァーガム」、「カロブبینガム」、「キサントガム」及び「カラヤガム」はカチカチに固まってしまい（図 C1）、メノウ乳鉢ですりつぶせなかったり、跳ねて飛びだしてしまったりした。また、メノウ乳鉢ですり混ぜたあとは、大部分は図 C2 の「卵殻焼成カルシウム」のように乳鉢からきれいに回収することができたが、「L-アルギニン」、「L-シスチン」、「ウコン色素」などは乳鉢に張り付いてしまい、薬さじですすっても落としきれない物もあった。

また、予備的な測定結果において多糖類についてはデータに不備が見られたため、「グァーガム」及び「カロブبینガム」の 2 製品

のみは代表として標準粉末を用いて添加試料を調製した。

一方「カルナウバロウ」及び「カンデリラロウ」はロウであるためその性質から溶液やセルロース粉末を添加しても均一化は不可能であると考えられたため無添加試料のみを対象とした。また、「マリーゴールド色素」及び「トウガラシ色素」はロウほどではなかったが粘土のように固く、また疎水性であったことから、これらも無添加試料のみとした。

C-3-2) Pb 及び As のプロファイルの確認

Pb と As のプロファイルを図 C3 に示した。Pb 及び As の XRF 分析においては、Pb の L α 線と As の K α 線が重複するが、Pb は L β 線及び As は K β 線を測定することで分別測定可能であることが確認できた。

C-3-3) 散乱線内標準補正の有無の比較

EDX における測定においては、主成分の違い、X 線源の強度変動等の影響を補正する内標準補正が効果的であることが知られている。一般的な内標準補正は試料に内標準物質を添加する方法があるが、EDX の場合、X 線管球から照射された X 線が試料に当たって発生する散乱線（バックグラウンド）を用いた補正が可能である。そこで、散乱線内標準補正（以降、BG 補正とする）の効果を検証するため、対照用標準溶液及び試薬の L-アルギニンを用いて添加試料を調製し、BG 補正の有無での強度（ただし BG 補正の場合は強度比）を比較した。なお、標準溶液は 5 回繰り返し測定し、添加試料は 3 ロット調製し各 3 回繰り返し測定した。

その結果を図 C4 に示した。BG 補正がない場合、特に規格値相当（Pb : 2, As : 3 μ g/g）以上の濃度において Pb 及び As の両元素とも対照用標準溶液に比べ強度が大きくなる場合が多かった。一方 BG 補正有の場合、両元素とも対照用標準溶液とほぼ同等の数字が得られた。

以上の結果から、本研究においては BG 補正を行うこととした。

C-3-4) 試料の測定

BG 補正ありで測定した結果を図 C 5 に示した。ただし、L-アルギニンは C-3) の結果を再掲した。

Pb では、規格値相当である三角・緑色 (▲, Pb : 2 μ g/g) のラインを丸・黄緑色 (●, Pb : 2.4 μ g/g) 及び丸・赤色 (●, Pb : 3 μ g/g) が「卵殻焼成カルシウム」を除いて全て上回り、かつ、丸・紫色 (●, Pb : 無添加) が全て下回っていることが確認された。さらに、丸・薄オレンジ色 (●, Pb : 1 μ g/g) も全て下回っていた。つまり、標準溶液を基準として、Pb の含有量がそれを上回るか下回るか概ね判断可能であることが示された。

As においても、ほとんどの試料において規格値相当である三角・緑色 (▲, As : 3 μ g/g) のラインを丸・黄緑色 (●, As : 3.6 μ g/g)、丸・赤色 (●, As : 4.5 μ g/g) が上回り、かつ、丸・紫色 (●, As : 無添加) が全て下回っていることが確認され、さらに、丸・薄オレンジ色 (●, As : 1.5 μ g/g) も全て下回っていた。以上の結果から、As の含有量についても標準溶液を基準としてそれを上回るか下回るか概ね判断可能であることが示された。一方、「ブドウ果皮色素」及び「グァーガム」においては、無添加の丸・紫色 (●) においても三角・赤色 (▲, As : 4.5 μ g/mL) を大きく超えた。反対に、「卵殻焼成カルシウム」については、As だけではなく Pb においても規格値の 1.5 倍添加の丸・赤色 (●, Pb : 3 μ g/g & As : 4.5 μ g/g) において三角・緑色 (▲, As : 3 μ g/g) のラインを下回ることがあった。また、Pb においては、2 倍添加の丸・青 (●, Pb : 4 μ g/g & As : 6 μ g/g) の一部も下回っていた。

そこで、これらの原因を次項において考察した。

C-3-5) プロファイルの確認

C-4) の As において「ブドウ果皮色素」及び「グァーガム」の無添加試料が規格値のラインを超えたことから、全ての無添加試料の 9.5 ~ 15keV のプロファイルを確認した (図 C 6 - 1 ~ 4)。

無添加試料が規格値のラインを超えた「ブドウ果皮色素」及び「グァーガム」のうち、「グァーガム」については、Br の K α 線 (約 11.9keV) と K β 線 (約 13.3keV) の位置におよそ 5 : 1 のピークが確認された。K α 線と K β 線の強度比はおおよそ 5:1 であることが知られていること、PbL β 線及び AsK α +PbL α 線の位置にピークが検出されていないことから、これらは As ではなく Br に由来するピークであると考えられた。つまり、本研究で用いた「グァーガム」は Br を含んでおり、この Br の K α 線を As の K β 線として誤って検出された可能性が考えられた。一方「ブドウ果皮色素」においても Br の影響によると考えられた。Pb の L β 線及び AsK α +PbL α 線の位置にピークが検出されていないことから、As 由来ではないと考えられる。しかし、Br の K β 線と K α 線のピーク強度は約 1:1 で検出されたことから、Br の K β 線の位置に検出されているピークには他の元素に由来するピークが重なっており、本来はもう少し小さいと考えられた。ルビジウム (Rb) の K α 線が約 13.4keV に検出されるため、本研究で用いた「ブドウ果皮色素」は Rb を含む可能性もあった。

また、無添加試料における As の強度比がわずかに原点付近を超えた「カンデリラロウ」、「カルナウバロウ」及び「トウガラシ色素」についても、わずかではあったが Br の K α 線付近 (約 11.9keV) においてピークが検出されていたため、これらについても Br の影響で As と誤判定されたと考えられた。「マリーゴールド色素」については、AsK α +PbL α の位置にピークがあり、As の K β 線にわずかにピークが見られた。一方、Pb の L β 線及び Br の K β 線にピークが検出されなかったことから、規格値未満で As が含有されている可能性が示唆された。

さらに Pb の強度比が原点付近を超えた「L-シスチン」については、Se の K α 線 (約 11.2keV) の位置にわずかにピークが検出された。Se の K β 線と Pb の L β 線 (約 12.6keV) は近接して検出されることから、これは Se の影響であると考えられた。

このように、プロファイルを確認することで、他の元素の影響を受けているかどうかをある程度判断可能であることが示唆され、判定精度を高めることができると考えられた。

また、他に As や Pb のプロファイルを妨害する可能性がある元素として、Ga ($K\beta$: 約 10.3keV), Cr ($K\alpha+K\alpha$ (SUM) : 約 10.8keV), Bi ($L\alpha$: 約 10.8keV), Mn ($K\alpha+K\alpha$ (SUM) : 11.8keV) などが考えられたため、これらが共存する可能性がある場合はプロファイルによる確認が必要である。

C-3-6) 隣接ピーク分離

EDX 分析においては解析ソフトが自動的にカーブフィッティングを行い、重複しているピークを分離してそれぞれ別々のピークとして認識する。いわゆるデコンボリューションのような処理が行われている。今回用いた装置でも自動でピーク分離する機能があり、「ブドウ果皮色素」(無添加試料)における自動フィッティングによるピーク分離例を図 C 7 1)に示した。As の $K\beta$ 線 (約 11.7keV) と Br の $K\alpha$ 線 (約 11.9keV) を分離し、As の $K\beta$ 線として認識していることが分かる。しかし、本来「ブドウ果皮色素」には As が含有されていないが、その強度比から推定される含量は $6\mu\text{g/g}$ 相当と高い値であった (図 C 8)。これは機械的に処理しただけであり As と Br を特に認識したものではなく、そこまで正確に分離ができていなかったためと考えられた。そこで、As と Br をそれぞれ認識して分離するような設定を加えて改めて隣接ピーク分離を行ったところ、図 C 7 2)のようになり、またピーク強度比は機械的な処理に比べて 1/3 以下まで低減した

に、カーブフィッティングによってピーク認識の精度を高めることができる可能性が示唆されたが、それだけでは十分ではなく、前項で示したようにプロファイルの確認結果と合わせて本当に含有されているかされていないかを判断すべきだと考えられた。

C-3-7) 「卵殻焼成カルシウム」における強度低減の要因の推定

続いて、「卵殻焼成カルシウム」において、Pb と As のいずれにおいても規格値の 1.5 倍又は 2 倍の含量のものが規格値の対照用標準溶液の強度比よりも小さい値になった理由を考察した。

マトリックスが無機物の場合、試料中の Pb・As から発生した蛍光 X 線はマトリックス (無機物) に一部吸収される。一方、本研究では対照用標準溶液は水を用いて調製しており、この場合蛍光 X 線はマトリックスにほとんど吸収されない。つまり、「卵殻焼成カルシウム」における Pb と As の強度比が対照用標準溶液よりも小さい値となっていたのはマトリックスの影響であったと考えられた。坂本らによれば、平均原子番号*が 9.0 を下回る有機物であれば、水溶液検量線の適用が可能であるとしている。「卵殻焼成カルシウム」は酸化カルシウム (CaO) であり、その平均原子番号は 16.58 となり、9.0 を大きく上回った。

また、本研究で対象とした添加物の平均原子番号を表 C 1 に示した。ただし、既存添加物は混合物であるため平均原子番号の計算は主成分を用いた。平均原子番号が 9.0 を超えたのは「L-シスチン」のみであり、9.07 であった。図 C 5 の「L-シスチン」の添加試料の測定結

*平均原子番号とは 2 種類以上の元素からなる化合物の平均的な原子番号であり、 Z_{av} はそれぞれの元素の原子番号を Z_i 、質量濃度を C_i ($0 < C_i < 1$) とすると、 $Z_{av} = \sum C_i Z_i$ で表される。例えば H_2O の場合は、次式によって表される。

H_2O の分子量 = 18.015

H_2O のうちの H の重量比 = $1.0080 \times 2 / 18.015 = 0.11191$

H_2O のうちの O の重量比 = $15.999 \times 1 / 18.015 = 0.88809$

H_2O の平均原子番号 = {H の原子番号 (1) $\times$ 0.11191} + {O の原子番号 (12) $\times$ 0.88809} = 7.2166 となる。

(図 C 8)。しかしそれでも強度比はゼロにはならなかった。これは、As と Br を無理やり認識してしまったためと考えられた。このよう

果を改めて確認すると、As の $K\beta$ 線の結果において、対象用標準溶液の強度を下回る傾向が確認された。なお、Pb の $L\beta$ 線の結果は対照

用標準溶液よりも高めに出来ていたが、これは C-5) で述べたとおり Se の影響によるものであった。

一方、規格値の 1/2 相当 (丸・薄オレンジ色 (●)) の試料は「卵殻焼成カルシウム」及び「L-シスチン」のいずれにおいても原点を超えて検出されており、入っているかいないか、という確認は可能であると考えられた。

C-3-8) 最適なスクリーニング条件の検討

スクリーニングにおいて最も重要なことは、対象物質を含む試料を見逃さないことである。つまり、偽陰性 (False negative, 実際は含有しているのに含有していないと判定されること) と判断してはならない。一方で、その判断基準を厳しくし過ぎると、偽陽性 (False positive, 実際には含有していないのに含有していると判定されること) と判断される試料が増えることとなり、スクリーニングをする意味がなくなってしまう。そこでこれまでの結果を踏まえ、適切なスクリーニング条件を検討した。

図 C 5 に示した無添加試料 (●) を対象に、対照用標準溶液の Pb 及び As : 0 μ g/mL (▲) を基準とした場合、偽陽性と判定されたのは Pb 及び As で約 20 検体あった。つまりおよそ半分は含有されていると誤って判断されてしまい、スクリーニング効果は得られなかった。続いて、対照用標準溶液の Pb : 1, As : 1.5 μ g/mL (▲) を基準とした場合、Pb においては全て含有していないと正しく判定された (いわゆる True negative)。一方、As においては Br の影響があった「ブドウ果皮色素」及び「グァーガム」を除き含有していないと正しく判定された (True negative)。ただし、「ブドウ果皮色素」及び「グァーガム」についてもプロファイルを確認すれば As を含有していないと正しく判断できた。

次に規格値相当含有している試料 (●又は●) を対象とした。Pb 及び As : 0 μ g/mL (▲) と Pb : 1, As : 1.5 μ g/mL (▲) の強度比が一番高い値を基準とした場合、Pb 及び As のいずれも含有している試料であると正しく判定された (いわゆる True positive)。しかし、規格値相

当の対照用標準溶液 Pb : 2, As : 3 μ g/mL (▲) を基準とした場合、特に平均原子番号が高い試料において偽陽性と判定される場合があった。

以上の結果から、規格値の 1/2 相当 (▲, Pb : 1 及び As : 1.5 μ g/mL) の対照用標準溶液を基準とすることで、Pb 及び As を規格値相当濃度含有する試料を確実に選抜することができ、また Pb 及び As を含有しない試料を含有すると判断することもほとんどないと考えられ、スクリーニング法として適用可能であると期待された。

D. 結論

D-1) EDX を用いた Pb 及び As 定量法の検討

EDX を用いて公定書における食品添加物中の鉛 (Pb) 及びヒ素 (As) の定量法を検討した。粉末の試料を対象に標準添加法での定量法を検討した。試料としてケイソウ土、卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンを用いた。規格値相当濃度で添加回収試験を実施した結果、回収率はいずれも 80%以上、特にケイソウ土では 100%に近い結果が得られた。卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンで回収率がケイソウ土に比べ低い値になった要因は、卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンの Pb 及び As の規格値がケイソウ土に比べ低いため装置の感度の問題があったと考えられた。また、これらの試料には若干の溶解性があり、添加試料や測定添加試料調製時に一部溶解し、そのため均一な試料調製が出来なかった可能性も考えられた。そこで来年度以降は、水溶液を添加しない標準添加法や内標準法による定量法の検討を進める予定である。

また、本研究において、ケイソウ土中に Pb 及び As が約 10 μ g/g 含有されていることが確認されたが、これらはほとんど食品へ移行しないことが示され、健康影響はほとんどないと考えられた。

D-2) 窒素定量法の比較

窒素定量に課題がある「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」を試料に

用いて、公定法を含む複数の窒素定量法の定量値及び操作性等を比較した。

定量値はいずれの定量法でもほぼ同程度の値が得られた。またいずれの精度も同等であった。ケルダール法は試験者や環境への負荷が大きい分析法であること、一方元素分析法は迅速かつ簡便ではあるが初期投資の負担が大きいことが改めて示された。

以上の結果を踏まえると、「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」に対しては、公定法の試料量を少なくした公定法改法を導入することが最も簡単であると考えられた。一方、元素分析法は複数の元素を測定可能な装置も有ることから、複数部署で共有して使用できると考えられる。したがって、将来的には試験者や環境への負荷低減のため元素分析法へシフトしていくべきであると考えられた。

D-3) EDX を用いた Pb 及び As スクリーニング法の検討

EDX を公定書における食品添加物中の鉛 (Pb) 及びヒ素 (As) のスクリーニング法へ適用できるかどうかを検討した。

初めに散乱線内標準補正の有無による効果を検証した。その結果、散乱線内標準補正を行うことで対照液の強度との比較判定をより正確に行うことができ、ある程度含量の予想も可能であることが示された。また、臭素 (Br) などの共存元素の影響によって、含量を多く見積もってしまう場合があったが、プロファイルを確認したり、ピーク分離処理を行うことで実際に含有しているのか含有していないのか正しく判断が可能であった。一方、平均原子番号が 9.0 を超える試料や主成分が無機物である試料においては蛍光 X 線の感度が低下するため、水で調製した対象用標準溶液の強度比よりも低く見積もられる可能性があったが、規格値の 1/2 の濃度の対照用標準溶液を基準として用いることで、規格値相当濃度含まれる Pb や As を見逃すことなく確実に選抜することができるうえ、これらを含めない試料を誤って判定する可能性も極めて低かつ

た。

以上のように EDX を用いて Pb 及び As を規格値相当含有するかしないかのスクリーニングは可能であることが示された。EDX による分析は試薬を使用しないうえ、前処理は不要でさらに測定時間も短い。つまり環境や試験者への負荷も小さい分析法である。今後さらなる対象拡大へ向けて引き続き検討を行う予定である。

E. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 渡辺実薫, 御所窪誠, 伊藤朱美, 藤松芽生, 座間俊輔, 阿部 裕, 建部千絵, 多田敦子, 杉本直樹: 食品添加物公定書における窒素定量法の検証, 日本食品衛生学会第 120 回学術講演会(2024.11).
- 2) 中島 馨, 増本直子, 阿部 裕, 杉本直樹: 相対モル感度(RMS)を用いたクロロゲン酸類の一斉分析法の検討 ~クロロゲン酸類縁体の構造と RMS の関係~, 日本食品衛生学会第 120 回学術講演会(2024.11).
- 3) 石附京子, 阿部裕, 杉本直樹: エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置(EDX)を用いた食品添加物中の鉛及びヒ素の定呈法の検討、第 61 回全国衛生化学技術協議会年会 (2024.11).
- 4) 渡辺実薫: 食品添加物公定書における窒素定量法の代替試験法の検証. 第 7 回(公社)日本食品衛生学会近畿ブロック勉強会 (2025.2).

2. 論文発表等

なし

3. 総説, 解説等

- 1) 阿部 裕, 多田敦子: 第 10 版食品添加物公定書における改正のポイント. 月刊フードケミカル, 2024; 5: 20-24.

G. 知的財産権の出願, 登録状況

なし

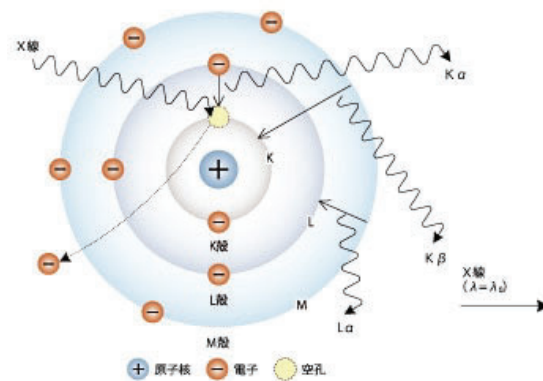


図 A 1 蛍光 X 線の原理・特徴

(<https://www.an.shimadzu.co.jp/products/elemental-analysis/edx-fs/edx-700080008100/index.html>)

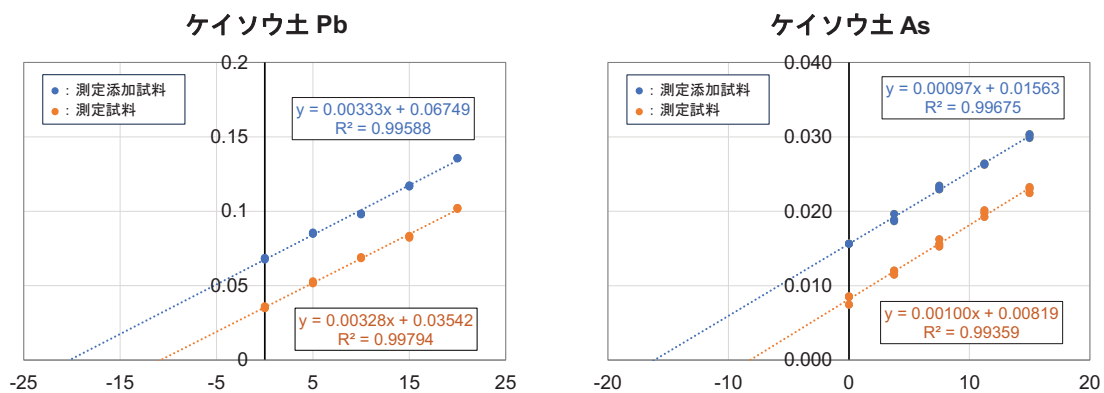


図 A 2 - 1 ケイソウ土の Pb 及び As の関係線（一例）

（縦軸：強度，横軸：添加濃度（ $\mu\text{g/g}$ ））

決定係数が最も小さい値だった関係線を一例として示した．

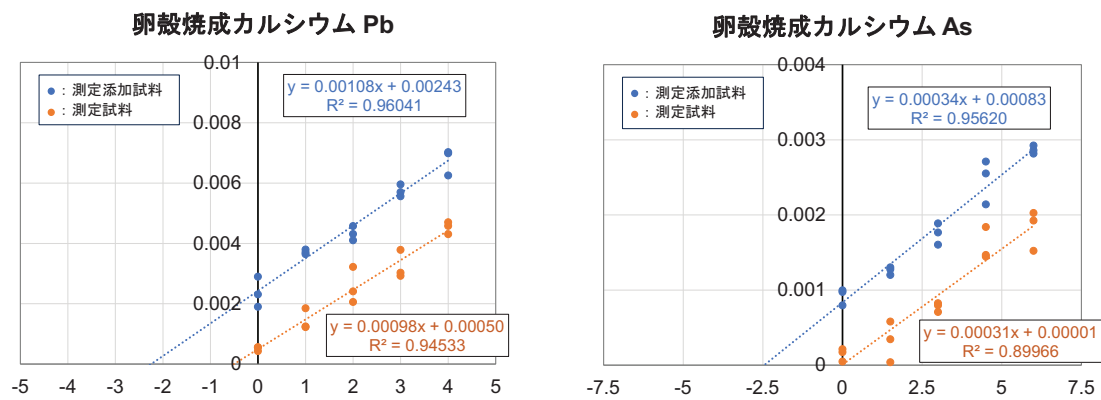


図 A 2 - 2 卵殻焼成カルシウムの Pb 及び As の関係線 (一例)

(縦軸：強度，横軸：添加濃度 (μg/g))

決定係数が最も小さい値だった関係線を一例として示した。

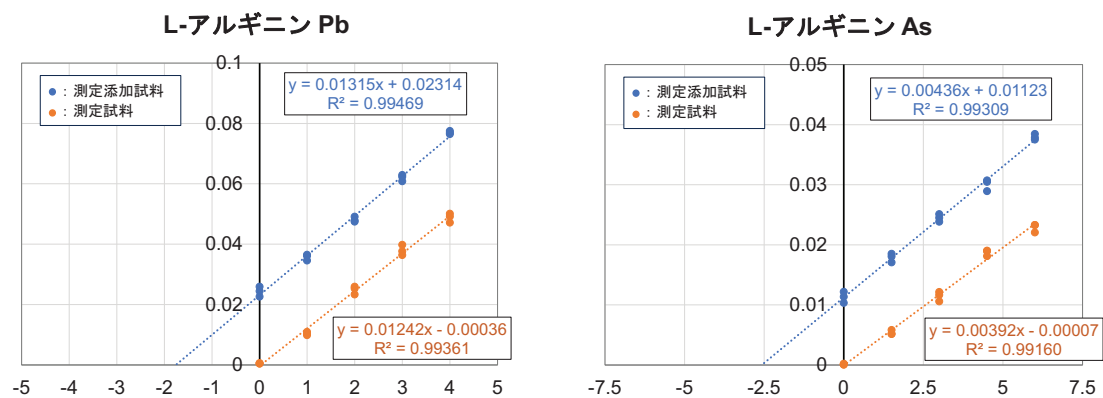


図 A 2-3 L-アルギニンの Pb 及び As の関係線（縦軸：強度，横軸：添加濃度（ $\mu\text{g/g}$ ））

表 A 1 本研究で用いた試料

試料	当部 管理番号	公定書における規格値	
		Pb	As
ケイソウ土	C2308	10 µg/g 以下*	7.5 µg/g 以下*
卵殻焼成 カルシウム	C2342	2 µg/g 以下	3 µg/g 以下
L-アルギニン	C2256	2 µg/g 以下	3 µg/g 以下

*食品添加物への移行を考慮した規格値

表 A 2 試料及び添加試料中の Pb 及び As 含量並びに回収率

試料	Trial	試料 (μg/g)		添加試料 (μg/g)		回収率 (%)	
		Pb	As	Pb	As	Pb	As
ケイソウ土	1	10.5	8.2	20.3	15.6	96.3	95.3
	2	10.6	8.2	20.7	16.2	100.3	103.3
	3	10.8	8.8	20.3	15.6	96.1	95.8
	Ave	10.6	8.4	20.4	15.8	97.6	98.1
	RSD (%)	1.4	4.3	1.2	2.1	2.4	4.6
卵殻焼成 カルシウム	1	0.2	0.0	2.2	2.5	97.8	77.2
	2	0.2	0.3	1.7	2.5	68.5	79.6
	3	0.5	0.1	2.0	2.3	87.2	70.9
	Ave	0.3	0.1	2.0	2.4	84.5	75.9
	RSD (%)	64.4	93.7	15.0	5.6	17.6	5.9
L-アルギニン	1	0.0*	0.0*	1.8	2.6	88.0	85.8

*関係線における定量値がマイナスの値となったため、定量値は 0 (ゼロ) とみなした.

装置

概略は、図 1 による。ただし、接続部は、すり合わせにしてもよい。

A：ケルダールフラスコ（硬質ガラス製 容量約300mL）

B：ガラス管

C：アルカリ溶液注入用漏斗

D：ゴム管（BとCを連結する。途中にピンチコックが付けてある。）

E：しぶき止め

F：蒸留管

G：冷却器

H：吸収用フラスコ（容量約300mL）

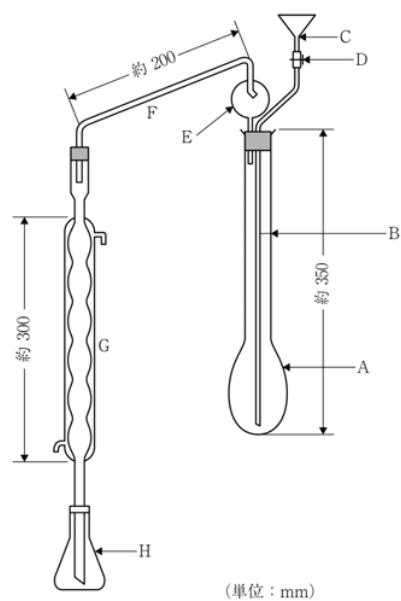


図 B 1 ケルダール法の装置²⁾



図 B 2 加熱分解装置((DigiPREP HT250-20, 株式会社 SCP SCIENCE 製)



図 B 3 自動蒸留滴定装置((VAPODEST 500, ゲルハルトジャパン株式会社製)



図 B 4 改良デュマ法で用いた装置
((SUMIGRAPH NC-TRINITY, 株式会社住友分析センター製)

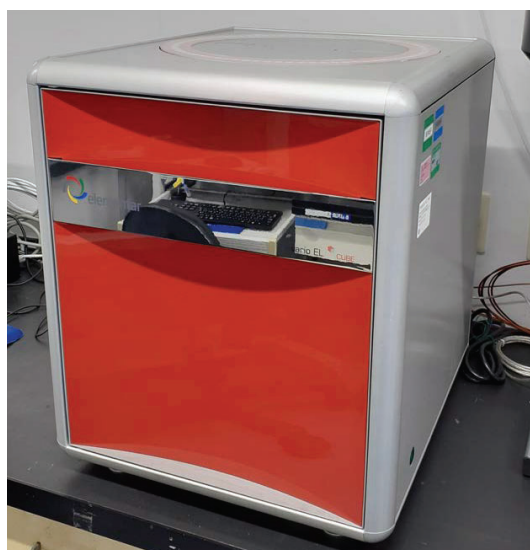


図 B 5 CHN コーダー法で用いた装置
((vario EL cube, エレメンター・ジャパン株式会社製)

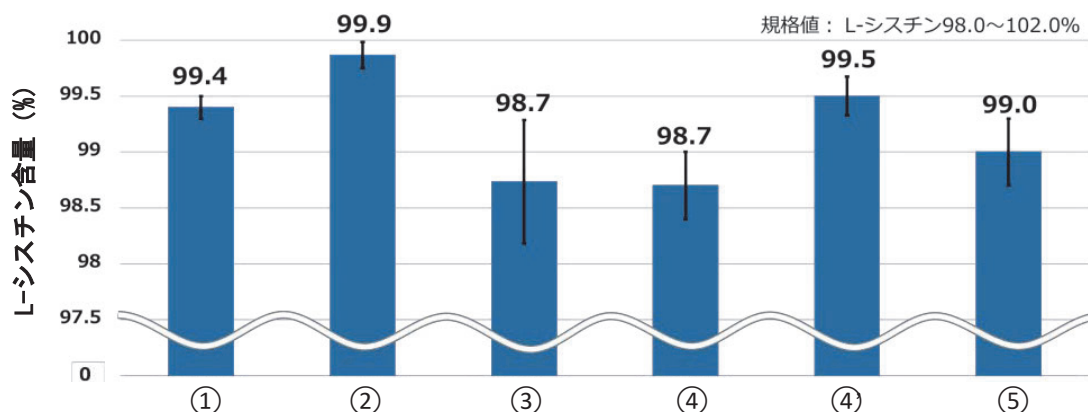


図 B 6 L-シスチン含量(%, n=3)

- ① 公定法((ケルダール法), ② 公定法改法((ケルダール法),
- ③ セミマイクロケルダール法,
- ④ 元素分析法((改良デュマ法)・試料量 0.5g,
- ④' 元素分析法((改良デュマ法)・試料量 0.25 g,
- ⑤ 元素分析法((CHN コーダー法)

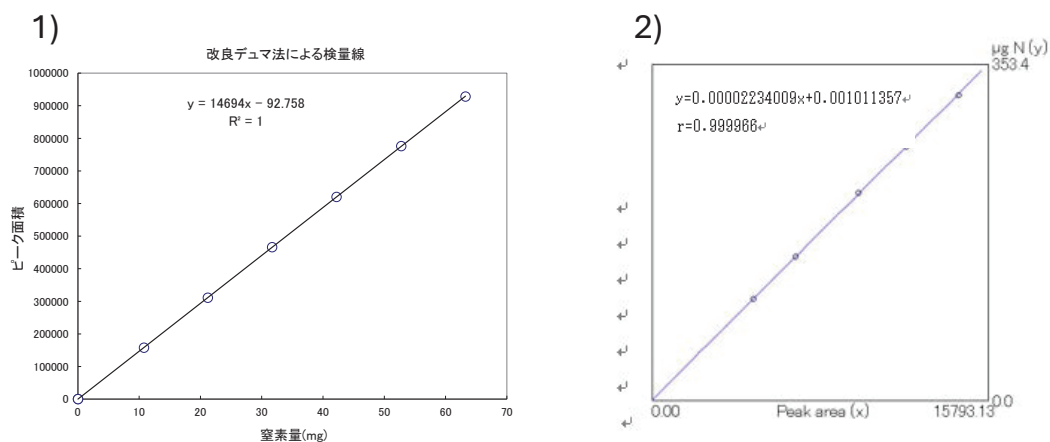


図 B 7 元素分析法による検量線

- 1)改良デュマ法((標準品：EDTA，検量線範囲：窒素量として10~64 mg)
- 2)CHN コーダー法((標準品：アセトアニリド，検量線範囲：窒素量として約 0.1~0.3 mg)

なお、CHN コーダー法の検量線は装置からとりだされたものであるため縦軸の記載がない。

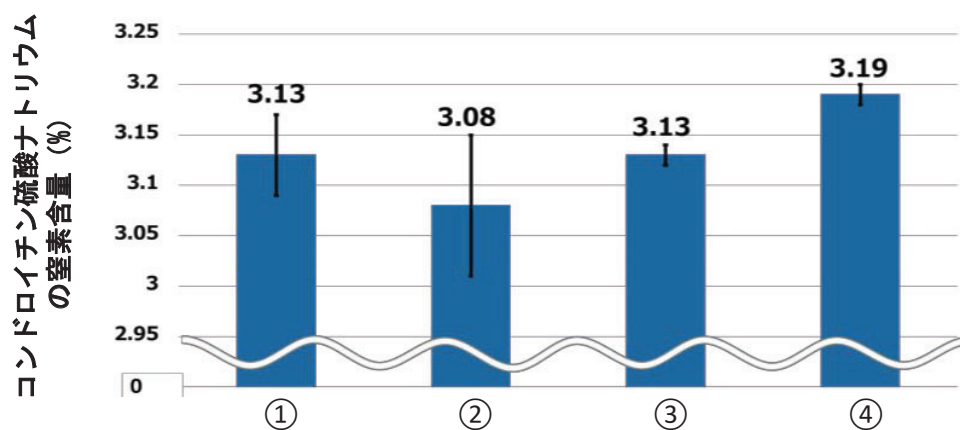


図 B8 コンドロイチン硫酸ナトリウムの窒素含量 ((%, n=3)

- ① 公定法((ケルダール法)、② 公定法改法((ケルダール法)、
③ セミマイクロケルダール法、④ 元素分析法((改良デュマ法)



図 B9 ケルダール分解装置((同時加熱式)

表 B 1 L-シスチンの試験結果

No	試験方法	試行数	空試験滴定量 (mL)	滴定量 (mL)	空試験差引後 滴定量 (mL)	試料採取量 (g)	滴定液 7.4%	Nとして			L-シスチンとして		
								計算値 (%)	平均値 (%)	相対 標準偏差 (RSD, %)	計算値 (%)	平均値 (%)	相対 標準偏差 (%)
①	公定法 (ケルダール法)	1回目	25.01	0.05	24.96	0.3024	1.001	11.58			99.3		
		2回目	25.01	0.07	24.94	0.3020	1.001	11.58	11.58	0.07	99.4	99.4	
		3回目	25.01	0.08	24.93	0.3016	1.001	11.59			99.5		
②	公定法改法 (ケルダール法)	1回目	25.01	8.27	16.74	0.2019	1.001	11.63			99.8		
		2回目	25.01	8.39	16.62	0.2004	1.001	11.63	11.64	0.11	99.8	99.9	
		3回目	25.01	8.37	16.64	0.2003	1.001	11.65			100.0		
③	セミクロ ケルダール法	1回目	1.129	25.924	24.795	0.0304	1.000	11.44			98.2		
		2回目	1.129	26.059	24.930	0.0302	1.000	11.57	11.51	0.55	99.3	98.7	
		3回目	1.129	26.129	25.000	0.0304	1.000	11.51			98.7		
④	元素分析法 (改良デュマ法) 試料量：0.5 g	1回目	-	-	-	0.5063	-	11.47			98.4		
		2回目	-	-	-	0.5051	-	11.54	11.50	0.31	99.0	98.7	
		3回目	-	-	-	0.5007	-	11.50			98.7		
④'	元素分析法 (改良デュマ法) 試料量：0.25 g	1回目	-	-	-	0.2508	-	11.58			99.3		
		2回目	-	-	-	0.2501	-	11.51	11.54	0.35	98.7	99.0	
		3回目	-	-	-	0.2505	-	11.54			99.0		
⑤	元素分析法 (CHN コーダー法)	1回目	-	-	-	0.0020362	-	11.58			99.4		
		2回目	-	-	-	0.0019561	-	11.63	11.60	0.22	99.7	99.5	
		3回目	-	-	-	0.0019009	-	11.58			99.4		

表 B 2 コンドロイチン硫酸ナトリウムの試験結果

No	試験方法	試行数	空試験滴定量 (mL)	滴定量 (mL)	空試験差引後 滴定量 (mL)	試料採取量 (g)	滴定液 フタケ-	Nとして		
								計算値 (%)	平均値 (%)	相対 標準偏差 (RSD, %)
①	公定法 (ケルダール法)	1回目	25.02	2.50	22.52	1.0014	1.001	3.15		
		2回目	25.02	2.91	22.11	1.0027	1.001	3.09	3.13	1.20
		3回目	25.02	2.37	22.65	1.0051	1.001	3.16		
②	公定法改法 (ケルダール法)	1回目	25.02	6.98	18.04	0.8016	1.001	3.16		
		2回目	25.02	7.62	17.40	0.8035	1.001	3.04	3.08	2.27
		3回目	25.02	7.66	17.36	0.8025	1.001	3.03		
③	セミミクロ ケルダール法	1回目	1.129	23.880	22.751	0.10185	1.000	3.13		
		2回目	1.129	23.555	22.426	0.10028	1.000	3.13	3.13	0.29
		3回目	1.129	23.449	22.320	0.10036	1.000	3.12		
④	元素分析法 (改良デュマ法)	1回目	-	-	-	0.5022	-	3.19		
		2回目	-	-	-	0.5061	-	3.19	3.19	0.21
		3回目	-	-	-	0.5041	-	3.18		

表 C1 試料情報

番号	添加物	規格値 (µg/g)		添加試料調製法*	平均原子番号	主成分
		Pb	As			
1	「カンデリラロウ」	2	3	添加なし	5.26	ヘントリアコンタンとして
2	「カルナウバロウ」	2	3	添加なし	5.39	セロチン酸ミリシルとして
3	「トウガラシ色素」	2	3	添加なし	5.68	カプサンチンとして
4	「マリーゴールド色素」	3	3	添加なし	5.78	アスタキサンチンとして
5	「L-ロイシン」	2	3	溶液	6.10	L-ロイシン
6	「ウコン色素」	2	3	溶液	6.25	クルクミンとして
7	「L-プロリン」	2	3	溶液	6.28	L-プロリン
8	「L-チロシン」	2	3	溶液	6.30	L-チロシン
9	「L-ヒスチジン」	2	3	溶液	6.39	L-ヒスチジン
10	「ブドウ果皮色素」	2	3	溶液	6.48	シアニジンとして
11	「L-グルタミン」	2	3	溶液	6.50	L-グルタミン
12	「微結晶セルロース」	2	3	溶液	6.68	セルロース
13	「L-セリン」	2	3	溶液	6.71	L-セリン
14	「グァーガム」	2	3	粉末	6.73	グルコースとして
15	「キサンタンガム」	2	3	溶液	6.73	グルコースとして
16	「カロブبینガム」	2	3	粉末	6.73	グルコースとして
17	「カラヤガム」	2	3	溶液	6.73	グルコースとして
18	「L-シスチン」	2	3	溶液	9.07	L-シスチン
19	「卵殻焼成カルシウム」	2	3	溶液	16.58	酸化カルシウム

*添加なしは試料との相性が悪いため添加しなかったもの、溶液は標準溶液、粉末は標準粉末を添加したことを示す。

表 C2 EDX 測定条件

X 線管球	Rh ターゲット
管電圧	50 [kV]
管電流	最大 100 [μ A]、自動
デッドタイム	30 [%]
コリメータ	10 [mm ϕ]
スピン	なし
雰囲気	大気
検出器	SSD
測定元素	Pb、As
処理	定量
1 次フィルタ	#4
積分時間	1800 [秒]
エネルギー範囲	PbLb1 12.38-12.88keV AsKa+PbLa 10.30-10.80keV AsKb 11.48-11.98 keV
測定元素	BG
処理	補正
1 次フィルタ	なし
積分時間	100 [秒]
エネルギー範囲	13-14 keV



図 C1 標準液滴下、乾燥後の試料の様子



図 C2 乳糖ですり混ぜた後の様子

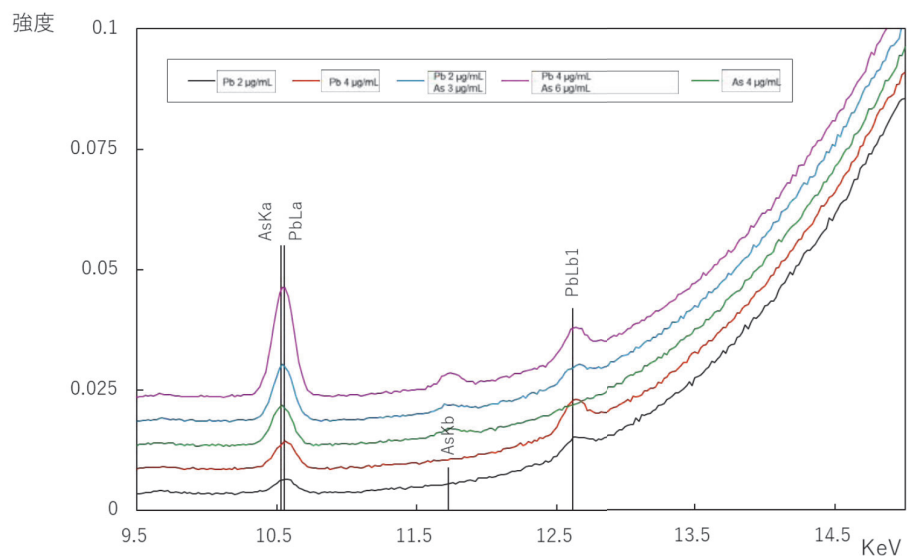


図 C3 Pb 及び As 標準溶液の EDX プロファイル

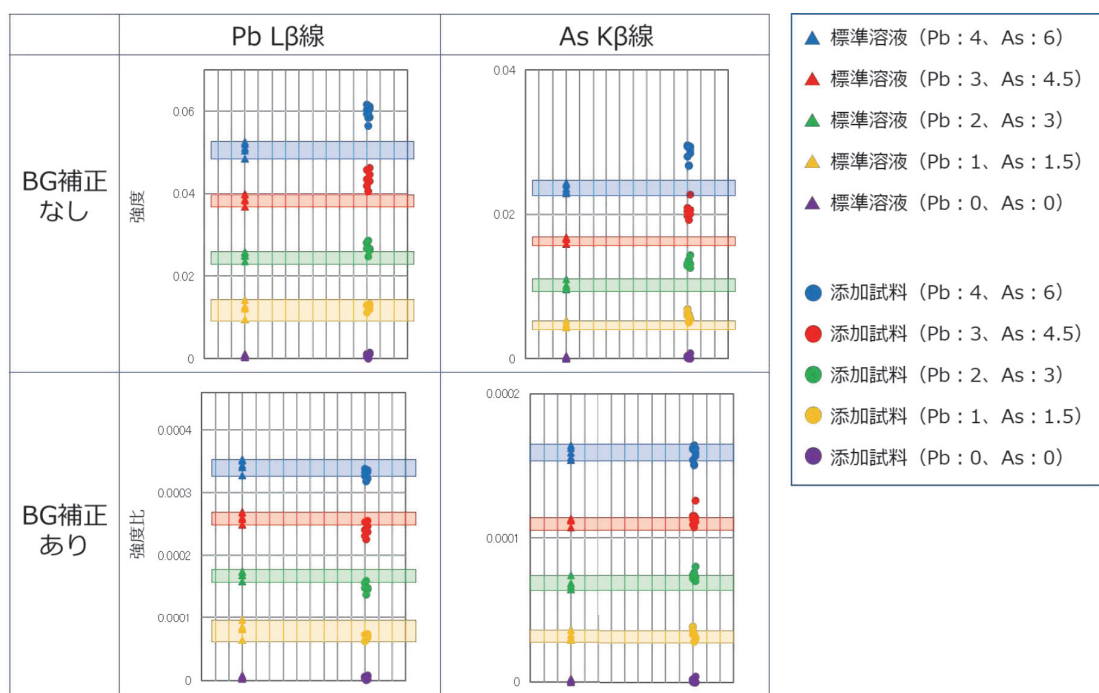


図 C4 BG補正有無における強度（強度比）の比較

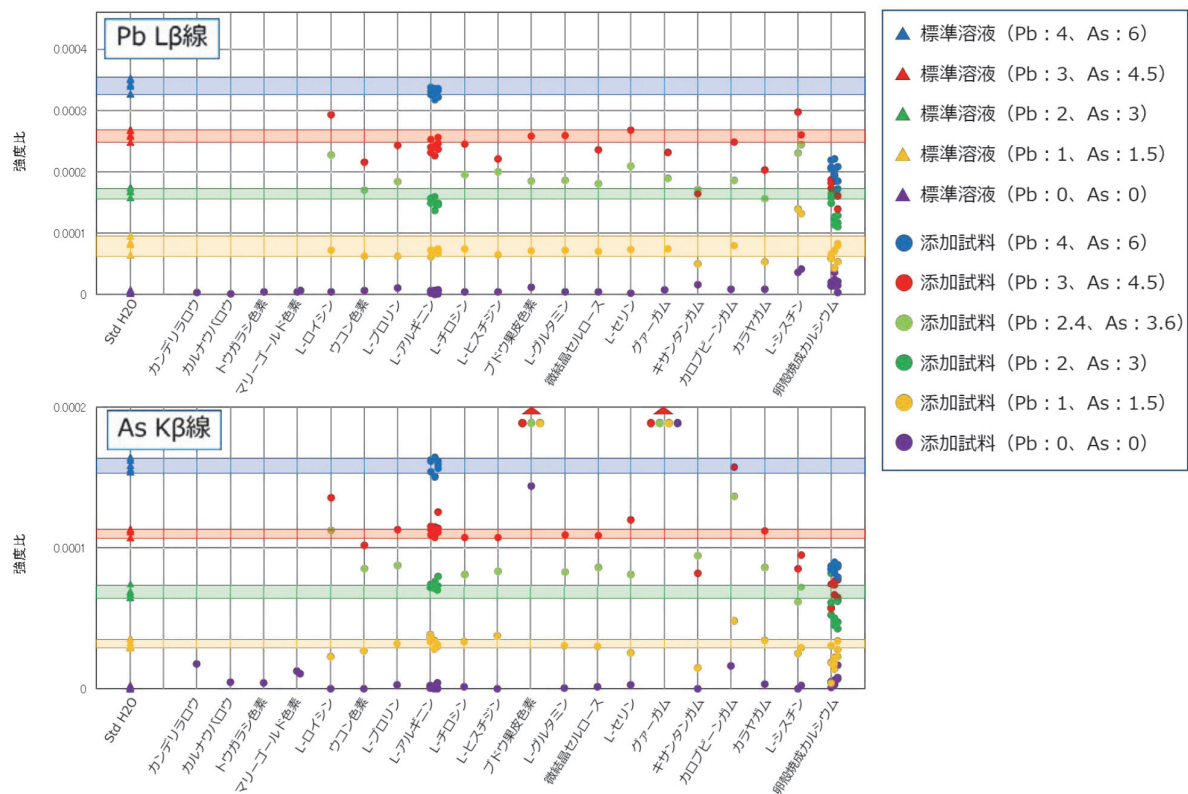


図 C5 試料の測定結果(BG 補正あり)

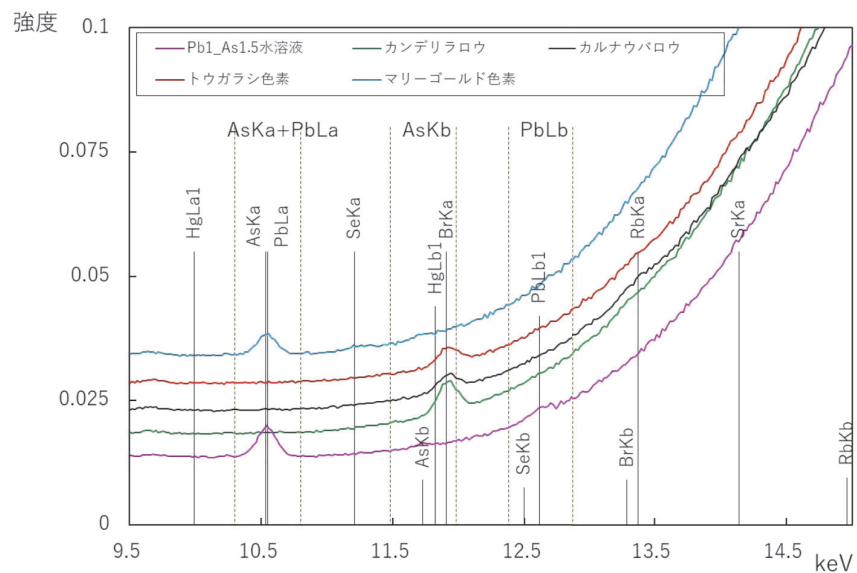


図 C6-1 各試料のプロファイル(9.5~15.0keV)

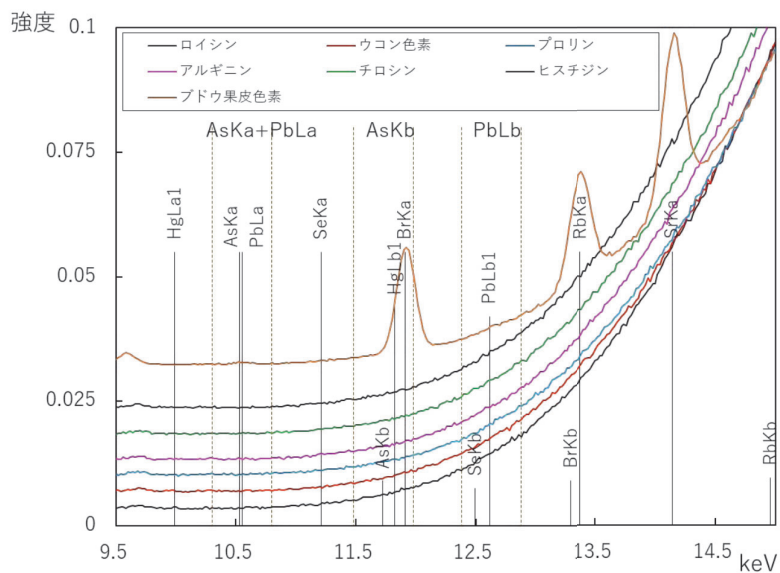


図 C6-2 各試料のプロファイル(9.5~15.0keV)

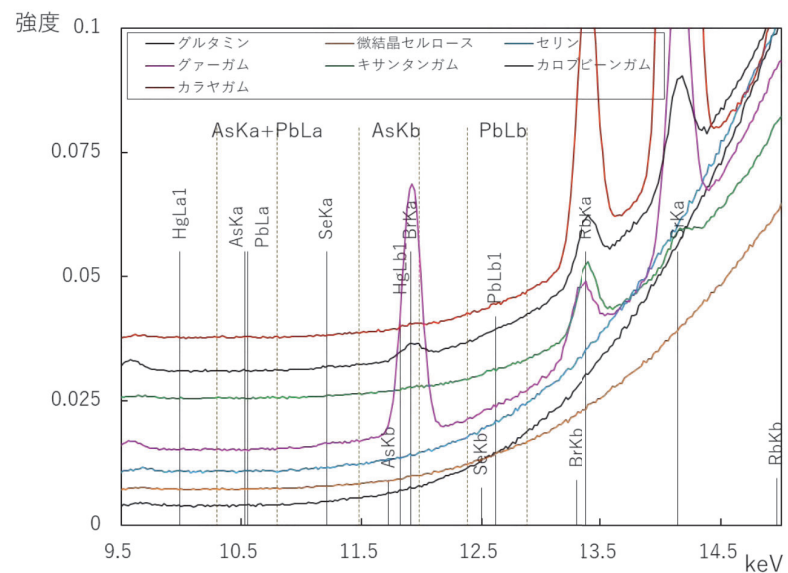


図 C6-3 各試料のプロファイル(9.5~15.0keV)

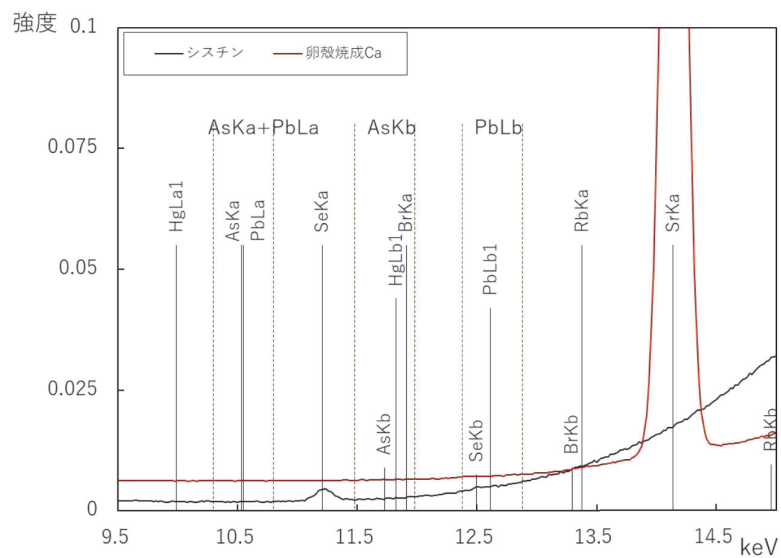


図 C6-4 各試料のプロファイル(9.5~15.0keV)

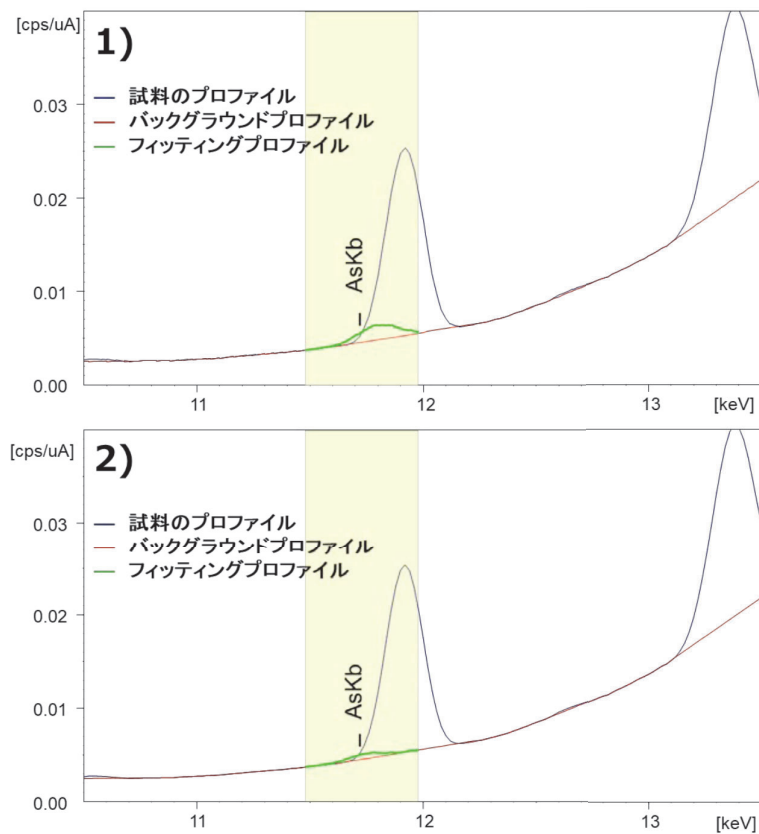


図 C7 「ブドウ果皮色素」を用いたカーブフィッティングの例

1) 自動カーブフィッティングの例

2) AsとBrを認識して分離するように設定したカーブフィッティングの例

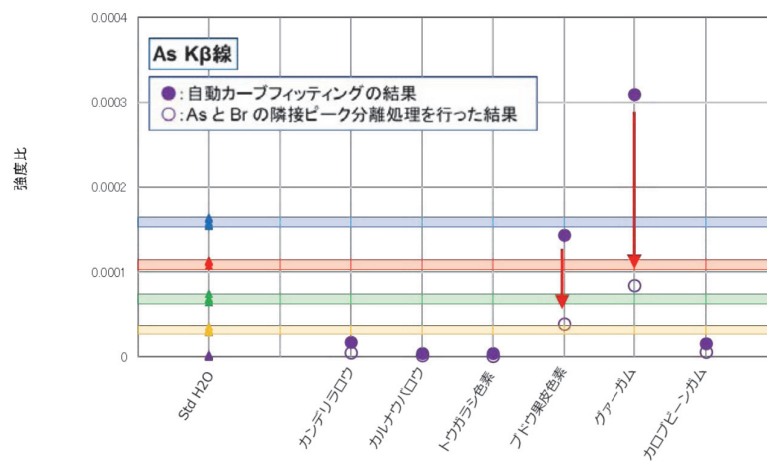


図 C8 隣接ピーク分離による補正効果