

イオンクロマトグラフィー/ICP-MS による 食品に含まれるヒ素化合物の形態別定量試 験法に関する研究

三重大学大学院 工学研究科
博士後期課程 材料科学専攻
416DA01 大脇進治

目次

略語一覧

序論	6
1. ヒ素とは	7
2. ヒ素の循環	7
3. 食品中のヒ素化合物	8
4. ヒ素化合物の定量試験法	9
5. 本研究の目的	10
6. 本論文の概要	11
本論	18
第1章 IC/ICP-MSによる海藻及びコメ中ヒ素化合物の形態別定量試験法の検討	19
1.1 はじめに	19
1.2 実験	20
1.2.1 試料	20
1.2.1.1 認証標準物質	20
1.2.1.2 海藻	20
1.2.1.3 コメ	21
1.2.2 試薬及び標準物質	21
1.2.2.1 試薬	21
1.2.2.2 標準物質	22
1.2.3 装置	22
1.2.3.1 IC	22
1.2.3.2 ICP-MS	22
1.2.3.3 加熱処理装置	22
1.2.4 試験方法	23
1.2.4.1 試験法の妥当性評価	23
1.2.4.2 総ヒ素の定量方法	23
1.2.4.3 海藻試料のヒ素化合物の抽出方法	24
1.2.4.4 コメ試料のヒ素化合物の抽出方法	24
1.2.4.5 IC/ICP-MSによるヒ素化合物の形態別定量	24
1.3 結果及び考察	25

1.3.1	試験法の妥当性評価	25
1.3.2	海藻中のヒ素化合物の含有量	26
1.3.3	コメ中のヒ素化合物の含有量	26
1.4	まとめ	27
第 2 章	IC/ICP-MS による柑橘類の果実のメチルアルソン酸定量試験法の検討 ...	45
2.1	はじめに	45
2.2	実験	46
2.2.1	試料	46
2.2.2	試薬及び標準物質	46
2.2.2.1	試薬	46
2.2.2.2	標準物質	46
2.2.3	装置	47
2.2.3.1	IC	47
2.2.3.2	ICP-MS	47
2.2.3.3	加熱処理装置	47
2.2.4	試験方法	47
2.2.4.1	試験法の妥当性評価	47
2.2.4.2	試験溶液の調製	48
2.2.4.3	IC/ICP-MS による MMA の定量	48
2.3	結果及び考察	48
2.4	まとめ	49
第 3 章	IC/ICP-MS によるペットフード中の無機ヒ素化合物の定量試験法の検討 ..	61
3.1	はじめに	61
3.2	実験	62
3.2.1	試料	62
3.2.2	試薬及び標準物質	62
3.2.2.1	試薬	62
3.2.2.2	標準物質	63
3.2.3	装置	63
3.2.3.1	IC	63
3.2.3.2	ICP-MS	63

3.2.3.3 加熱処理装置	63
3.2.4 試験方法	64
3.2.4.1 試験法の妥当性評価	64
3.2.4.2 試験溶液の調製	64
3.2.4.3 IC/ICP-MS による iAs の定量	65
3.3 結果及び考察	65
3.4 まとめ	67
結論	91
1. 結論	92
2. 今後の展望	93
謝辞	95
文献	96

略語一覧

略語	英語	日本語
AS3MT	arsenic(3) methyltransferase	ヒ素メチル基転移酵素
As	arsenite	亜ヒ酸
As	arsenate	ヒ酸
AsB	arsenobetaine	アルセノベタイン
BHA	butylated hydroxyanisole	ブチルヒドロキシアニソール
BHC	benzene hexachloride	ベンゼンヘキサクロリド
BHT	dibutylhydroxytoluene	ジブチルヒドロキシトルエン
CRM	Certified Reference Materials	認証標準物質
DDD	dichlorodiphenyldichloroethane	ジクロロジフェニルジクロロエタン
DDE	dichlorodiphenyldichloroethylene	ジクロロジフェニルジクロロエチレン
DDT	dichlorodiphenyltrichloroethane	ジクロロジフェニルトリクロロエタン
DMA	dimethylarsinic acid	ジメチルアルシン酸
FAMIC	Food and Agricultural Materials Inspection Center	独立行政法人農林水産消費安全 技術センター
FSA	Food Standards Agency	英国食品規格庁
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
iAs	inorganic arsenic	無機ヒ素化合物
IC	ion chromatography	イオンクロマトグラフィー
ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectrometry	誘導結合プラズマ質量分析装置
LD ₅₀	50% lethal dose	50%致死量
MMA	monomethylarsonic acid	メチルアルソン酸
NMIJ	National Metrology Institute of Japan	国立研究開発法人産業技術総合 研究所 計量標準総合センター
PP	polypropylene	ポリエチレン
PTFE	polytetrafluoroethylene	ポリテトラフルオロエチレン
PTWI	provisional tolerable weekly intake	暫定的耐容週間摂取量
SAHC	S-adenosyl-L-homocysteine	S-アデノシル-L-ホモシステイン
SAM	S-adenosyl-L-methionine	S-アデノシル-L-メチオニン
TMA	trimethylarsinic acid	トリメチルアルシン酸

TMAH	tetramethyl ammonium hydroxide	テトラメチルアンモニウム
WHO	World Health Organization	世界保健機関

序論

1. ヒ素とは

ヒ素は第 15 族元素、原子番号 33 の元素であり、メタロイドに属し金属と非金属の中間的性質をもつ金属光沢のある銀灰色の固体である。古くからヒ素は毒性を有することが知られており、世界の歴史を見ても、殺菌剤や化粧品の原料として使用されていたヒ素による中毒や毒薬として暗殺に使用されていたという記録もある。日本でも島根県や宮崎県の鉱山働く従業員と近隣住民に慢性的なヒ素中毒による健康被害が発生した。また、森永ヒ素ミルク中毒事件や和歌山毒物カレー事件など、食品へヒ素が混入し、多くの被害者を出す事件も起こった。ヒ素及びその化合物の毒性は発がん性、遺伝子障害性、生殖毒性などがある。これまでに起こった事件、事故、またヒ素についての研究が進んだことから、ヒ素の毒性について認知されるようになり、現在では多くの法令において規制の対象となっている(表 1)。

2. ヒ素の循環

自然界ではヒ素は地殻中に存在しており、火山活動や森林火災などの自然災害、鉱物の風化や地下水への溶出などによって環境中に放出される。一方で、ヒ素は、古くから産業活動にも利用されてきた。半導体材料、液晶用ガラス原料、医薬品原料、染料の原料などのほかに、その毒性を利用して、木材の防腐剤、殺鼠剤、農薬などにも利用されてきた。なお、日本では、農薬取締法に基づき登録されていたヒ素化合物の農薬は、1998 年までに全て登録が失効しており、現在は使用されていないが、米国では一部の農作物にヒ素化合物の農薬が使用されている。産業活動で利用されたヒ素もまた、廃棄物の焼却処分により環境中に放出される。農薬として使用されたヒ素化合物はそのまま土壌、地下水などに浸透する。

このように、ヒ素及びその化合物は、自然現象、人為的な活動などにより、環境中に放出されている。このため、ヒ素及びその化合物は農地や海水などの土壌、水中に微量ながら存在しており、これらの環境で育った動植物によって体内に取り込まれて蓄積され、食物連鎖の中で濃縮される。動植物に取り込まれたヒ素及びその化合物は、生物の代謝によって様々な化学形態に変化しながら存在する。一般的に、ヒ素化合物は無機態若しくは有機態のヒ素化合物に大別される。自然界に存在する化学種として、無機ヒ素化合物(inorganic arsenic、以下

「iAs」とする)には亜ヒ酸(arsenite、以下「As⁻」とする)、ヒ酸(arsenate、以下「As⁺」とする)があり、有機ヒ素化合物には代表的なものとしてメチルアルソン酸(monomethylarsonic acid、以下「MMA」とする)、ジメチルアルシン酸(dimethylarsinic acid、以下「DMA」とする)、トリメチルアルシンオキシド(trimethylarsine oxide、以下「TMAO」とする)、アルセノベタイン(arsenobetaine、以下「AsB」とする)など多種多様な化合物がある(図1)。これらのヒ素化合物の毒性は、iAsの方が有機ヒ素化合物よりも高いことが知られている[1]。iAsは動植物の体内に取り込まれた後、メチル化され、毒性の低い有機ヒ素化合物へと代謝される[2][3]。ヒ素化合物の代謝経路を図2に示す[4]。自然現象により環境中に放出されるヒ素化合物は、iAsの形態である場合が多い。また、有機ヒ素化合物は土壌中で微生物によりiAsに分解される。土壌環境中のヒ素化合物は植物の根から、海洋では海藻や植物プランクトンに吸収され、生体内で代謝により有機ヒ素化合物が合成される。さらにこれらの植物を動物が摂取することで、高次に代謝が進み、様々な有機ヒ素化合物が合成される。動植物の体内で生合成された有機ヒ素化合物は、排泄物や死骸が微生物によって分解される際に一緒にiAsに分解され、再び自然環境中に回帰する。このように、ヒ素化合物は生態系を循環している。

3. 食品中のヒ素化合物

自然環境中に放出されたヒ素化合物は、生態系を循環している。植物では、ヒ素化合物は根などから養分、水分と共に吸収され、代謝される。動物はそれらの植物や飲料水を摂取することにより、ヒ素化合物を体内に取り込んでいる。海洋生物は、陸上生物に比べて多くのヒ素化合物を取り込んで蓄積しており、数 $\mu\text{g/g}$ から、時には $100\mu\text{g/g}$ を超えることもある。ヒジキ、コンブなどの海藻類にも、ヒ素化合物は多く含まれており、 $100\mu\text{g/g}$ を超える場合もある。陸上生物では、ヒ素化合物の含有量は $1\mu\text{g/g}$ を超えるものはほとんどないが、コメ、きのこの類の含有量は比較的多く含有されている[5]。このように、ヒ素化合物の含有量が多い代表的な食物には、日本人の主食であるコメと、日本の伝統的な食習慣において摂取する機会の多い海藻や魚介類が含まれている。また、この中で、コメ及びヒジキについては、毒性の強いiAsの含有量が多いことが知られている。

ヒ素化合物の人体への影響は、短期間で大量に摂取した場合は、発熱、下痢、嘔吐、興奮、脱毛などの症状があらわれ、長期的に大量に摂取した場合は、皮膚組織の変化やがんの発生などの影響があるといわれている [6]。しかしながら、日本人は古くからコメ、海藻及び魚介類を多く摂取しているが、これらの食品を摂取したことで食中毒になったという報告は一例もない。それにも関わらず、2004年7月に英国食品規格庁(FSA)は、iAsを多く含むヒジキは食べないようにと勧告を出した。FSAの調査で、ヒジキは発がん性のリスクが心配されているiAsを多く含有しているという結果が得られたためである。この勧告に対して、厚生労働省は、ヒジキ中のヒ素に関するQ&Aを公表した [7]。その中で、2002年度の国民栄養調査から1日あたりのヒジキの摂取量を計算し、体重50 kgの人が毎日4.7 g(1週間で33 g)のヒジキを毎日継続的に摂取しない限り、世界保健機関(WHO)が1988年に定めたiAsの暫定的耐容週間摂取量(PTWI)である15 µg/kg体重/週を超えることはないとしている。また、海藻中に含まれるヒ素によるヒ素中毒などの健康被害が起きたとの報告もないため、バランスのよい食生活を心がければ健康上のリスクが高まることはないという見解を示した。

毒性の高いiAsを多く含むコメ及びヒジキについては、農林水産省のウェブサイトにてヒ素の摂取を減らすための調理法や研究・調査が紹介されている [8]。また海外では、iAsの含有量の基準値を設定している国際機関及び国もあり [9]、食品に含まれるiAsを適切に定量して評価することが重要となっている。

4. ヒ素化合物の定量試験法

ヒ素は食品中に様々な化学形態で存在しているが、毒性はiAsが強く、有機ヒ素化合物はメチル化などの化学修飾の程度が進むにつれて毒性が低下する(表2) [10]。そのため、ヒ素による食品の有害性を適切に評価するには、食品中のヒ素化合物を化学種ごとに定量し、それぞれの化合物の毒性の強さとその含有量を勘案する必要がある。しかし、食品衛生法などの公定法におけるヒ素化合物の定量試験法は、様々な化学形態のヒ素を硝酸などの酸化性試薬で処理し、全てをiAsに変換して総ヒ素として測定する方法が採用されている。この方法では、毒性の弱い有機ヒ素化合物も全てiAsとして測定されるため、健康被害のリスクについては過大に評価されることになり、食品としての価

値を低下させてしまう恐れがある。

近年、食品中のヒ素化合物をこれまでの総ヒ素として評価をする方法から、化学種ごとに定量する方法についての研究が盛んに行われている [11] [12] [13] [14] [15] [16]。主流となっているのは、分析対象となる食品を粉碎して均質化した試料を採取し、希硝酸やトリフルオロ酢酸、水、水-メタノール混液などを加えて加熱抽出を行い、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 又はイオンクロマトグラフィー (IC) でヒ素を化学種ごとに分離した後、誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) で定量するという方法である。ヒ素は形態によって抽出効率が異なるため、目的の形態のヒ素に適した溶液で抽出しなければならない。さらに、加熱抽出を行う際の温度が高すぎると、ヒ素の形態が変わってしまう可能性があるため注意が必要である。食品から抽出したヒ素化合物は、イオン対逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどの手法により化学種ごとに分離させる。この時、測定を ICP-MS で行うため、HPLC の移動相に無機塩類を含む溶液を用いることは、質量分析装置による測定の際に塩類が析出して ICP-MS のサンプリングコーンの穴径を小さくし、測定感度を低下させるほか、イオン化干渉、検出器の汚染が起こる場合があるため避けた方がよい。また、イオン対逆相クロマトグラフィーを用いる場合は、食品から抽出した液の pH を調整する必要があり、操作が煩雑である。

ペットフードについても同様であり、愛玩動物用飼料等の検査法 (平成21年9月1日付け21消技第1764号独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知、以下「ペットフード検査法」とする) [17] が平成30年4月23日 30消技第65号により一部改正され、以前までは総ヒ素としての定量試験法のみであったが、iAs を測定する方法が新たに収載された。この方法は、アルカリ溶液を用いてペットフードからヒ素化合物を抽出した後、イオン対逆相クロマトグラフィーにより化学種ごとに分離し、ICP-MS によりそれぞれの化学種ごとのヒ素化合物含有量を定量する方法である。

5. 本研究の目的

食品及びペットフードのヒ素化合物含有量の評価は、近年、総ヒ素の評価から化学種ごとに評価されるようになってきた。しかしながら、形態別定量試験の方法は煩雑な操作が多く、HPLC 又は IC の移動相と

して用いる試薬が ICP-MS にとって最適とは言い難い条件のものもあった。

本研究では、食品及びペットフードに含まれるヒ素化合物の形態別定量試験法について、IC 及び ICP-MS を用いて簡便で汎用性が高い方法を検討し、その方法の性能を評価することを目的とした。測定の対象とする試料及びヒ素化合物として、第一に、有毒な iAs を多く含むことが問題視されることのある海藻類及びコメを用いて、主要なヒ素化合物である iAs の As₃ 及び As₅ 並びに有機ヒ素化合物の MMA、DMA 及び AsB の形態別定量方法を検討することとした。第二に、米国で 2012 年まで農薬として柑橘類に使用されていた MMA について、現在においてもリスク管理の観点から不適切な使用が無いことを調べるための試験要望が高いことから、簡便な条件で測定ができる方法を検討することとした。第三に、ペットフード検査法に新たに追加された iAs の定量試験法について、より簡便な条件で測定が可能であるかを検討することとした。

これらの検討において良好な結果が得られることで、食品及びペットフードに含まれるヒ素化合物の含有量と有害性を適切に評価することができるようになり、健康リスクが管理しやすく、安全、安心な食生活が送れるようになることを期待する。

6. 本論文の概要

研究の目的にあるように、食品及びペットフードに含まれるヒ素化合物の形態別定量試験をより簡便で汎用性の高い条件で実施することを可能にするための検討を行った。

本論文の構成を図 3 に示す。序論では、本研究の定量試験の対象であるヒ素について、元素としての特徴と我々の生活環境との関わり、分析方法について解説し、本研究の目的を述べた。

本論では、ヒ素化合物の形態別定量試験法の検討について詳述した。まず第 1 章では、コメ及び海藻類について、含有量の多いヒ素化合物 5 種類の定量試験法を検討し、その方法の妥当性評価を行った。また、コメ及び海藻類の産地によって、ヒ素化合物の化学種の含有量に差が見られるのか調査を行ったので報告する。次に第 2 章では、米国において柑橘類に残留農薬の基準が設定されていた MMA について定量試験法を検討し、その方法の妥当性評価を行った。最後に第 3 章では、

ペットフードについて、iAs の定量試験法を検討した。ペットフード検査法を基に、より簡便な試験条件で実施できる方法を検討し、その妥当性評価を行った。

結論では、本論の第 1-3 章で行った検討の結果の総括を述べた。

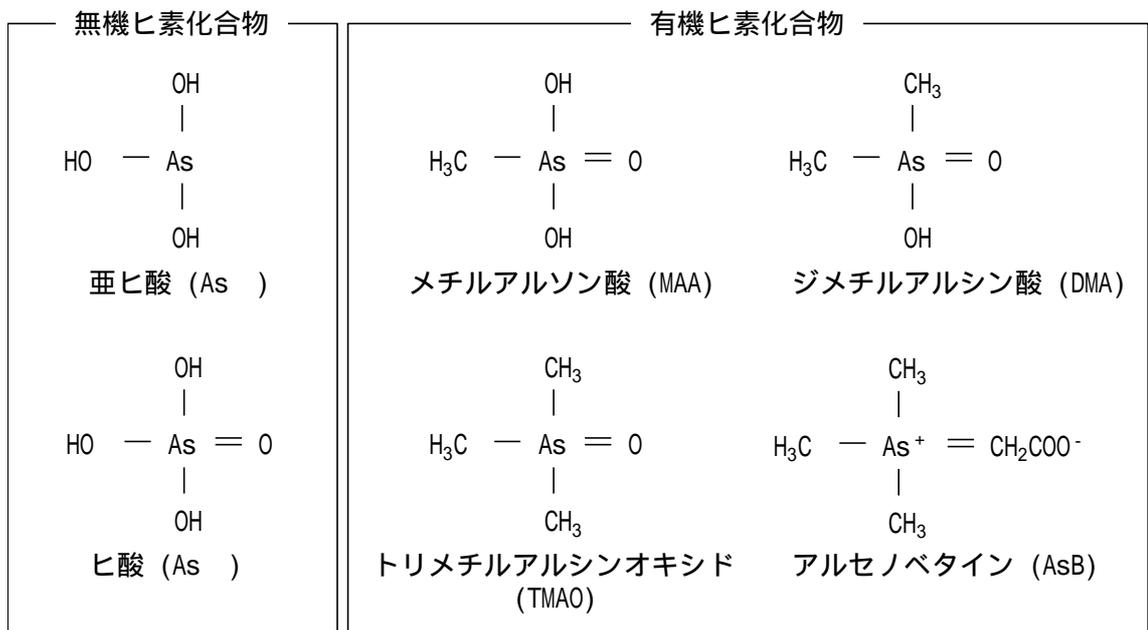
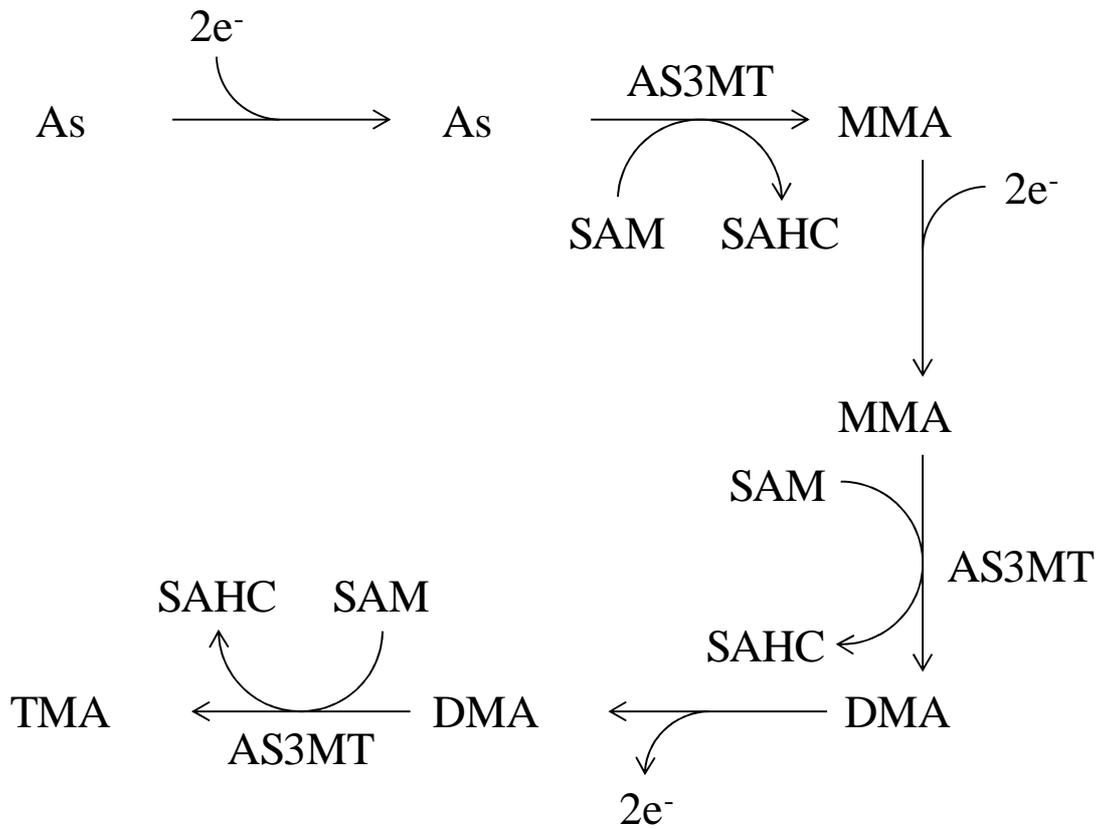


図1 無機ヒ素化合物及び有機ヒ素化合物の構造の一例



AS3MT : ヒ素メチル基転移酵素
 SAM : S-アデノシル-L-メチオニン
 SAHC : S-アデノシル-L-ホモシステイン

図2 ヒ素化合物の代謝

序論
本論
第1章 IC / ICP-MSによる海藻及びコメ中ヒ素化合物の形態別定量試験法の検討
第2章 IC / ICP-MSによる柑橘類の果実のメチルアルソン酸定量試験法の検討
第3章 IC / ICP-MSによるペットフード中の無機ヒ素化合物の定量試験法の検討
結論

図3 本論文の構成

表1 ヒ素及びその化合物に関する法令の一例

法律名	法律名・法律区分名
毒物及び劇物取締法	毒物(第2条 別表第1)
環境基本法	水質汚濁に係る環境基準 地下水の水質汚濁に係る環境基準 土壌の汚染に係る環境基準
大気汚染防止法	有害大気汚染物質
水道法	水質基準
下水道法	排水基準
水質汚濁防止法	排水基準
土壌汚染防止法	特定有害物質
土壌汚染対策法	特定有害物質
肥料取締法	公定規格
廃棄物処理法	特定管理産業廃棄物
食品衛生法	食品，添加物等の規格基準
愛玩動物用飼料の安全性の確保 に関する法律	販売用愛玩動物用飼料の成分規格
飼料の安全性の確保及び品質の 改善に関する法律	飼料中の化学物質に関する規制

表2 ヒ素化合物の急性毒性

被験物質	LD ₅₀ (mg/kg)	被験動物種	雌雄	投与方法
亜ヒ酸	20	ラット	雄/雌	経口
亜ヒ酸ナトリウム	42	ラット	雄/雌	経口
ヒ酸カルシウム	298	ラット	雌	経口
メチルアルソン酸	1,101	ラット	雄	経口
ジメチルアルシン酸	1,315	ラット	雄	経口
アルセノベタイン	>10,000	マウス	雄	経口

Environmental Health Criteria 224, WHO, 2001, ARSENIC AND ARSENIC COMPOUNDより抜粋

本論

第 1 章 IC/ICP-MS による海藻及びコメ中ヒ素化合物の形態別定量試験法の検討

1.1 はじめに

海藻及びコメは、ヒ素化合物の含有量が多いことが知られており、また、日本人の食習慣と密接に関わっている食品であることから、ヒ素化合物を化学種ごとに定量し、有害性を適切に評価する必要がある。食品に含まれるヒ素化合物を化学種ごとに定量するには、ヒ素化合物の化学形態を変化させずに食品から抽出しなければならない。不適切な条件での抽出は、有機ヒ素化合物を分解して iAs に変換する可能性があり、その食品の有害性を過大に評価し、食品の価値を下げることになる。

海藻及びコメに含まれる iAs の抽出方法には、加熱しながら希硝酸で抽出する方法が多くの研究で採用されている。この方法では、iAs だけでなく、有機ヒ素化合物である MMA、DMA 及び AsB なども抽出することが可能である。しかし、ICP-MS によるヒ素化合物の定量において、無機塩類を含む不揮発性の移動相を使用している報告が多く、ICP-MS にとって負荷が大きい条件での測定となっている。これに対しては、装置のインターフェース周辺を頻繁に洗浄するなどのメンテナンスで負荷を取り除くことはできるが、長時間の連続測定では一連の測定において感度が徐々に低下する可能性が考えられる。また、イオン対逆相クロマトグラフィーでは、イオン対試薬とヒ素化合物の反応は pH の影響を大きく受けるため、試験溶液の pH 調整を行う必要があり、操作が煩雑である。

そこで本章では、海藻及びコメ中のヒ素化合物を化学種ごとに定量し、iAs の含有量を適切に評価するための簡便且つ汎用性の高い方法として、0.15 mol/L 硝酸で抽出したヒ素化合物を、揮発性の移動相と陰イオン交換カラムを組み合わせた IC で分離を行った後、ICP-MS で定量を行う方法 [18] が適用できるか検討を行った。この試験法では、IC の移動相に揮発性の炭酸アンモニウム溶液を用いることで、ICP-MS への影響が少なく安定したヒ素化合物の形態別定量試験が可能となることを期待した。また、同時に複数の有機ヒ素化合物の抽出及び化学種ごとの定量が可能であることから、ヒ素含有量の多い食品の有害性に

ついて、適切に評価できると考えた。試験法の妥当性評価は「食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知平成 20 年 9 月 26 日食安発第 0926001 号、以下「金属試験妥当性評価ガイドライン」とする) [19]を参考に、認証標準物質について繰り返し試験を行い、本試験法の真度と精度を評価した。

さらに、本試験法を用いて、代表的な産地から収穫された海藻及びコメに含まれる iAs 並びに MMA、DMA 及び AsB の含有量と総ヒ素に対する iAs の含有比率を調査したので報告する。

1.2 実験

1.2.1 試料

1.2.1.1 認証標準物質

試験法の妥当性評価には、国立研究開発法人産業技術総合研究所の認証標準物質である NMIJ CRM 7405-a ひじき粉末(以下「標準ひじき」とする)及び NMIJ CRM 7533-a 玄米粉末(以下「標準玄米」とする)を用いた。なお、標準ひじきには、 As の含有量について 10.1 mgAs/kg、拡張不確かさ 0.5 mgAs/kg が認証値として付与されている。標準玄米には、 As と As を合算した iAs の含有量について 0.530 mgAs/kg、拡張不確かさ 0.016 mgAs/kg、DMA の含有量について 0.092 mgAs/kg、拡張不確かさ 0.004 mgAs/kg が認証値として付与されている。

1.2.1.2 海藻

海藻は国内における流通量の多い産地で収穫されたものを代表検体として、市販の乾燥品を購入して本研究に用いた。ヒトエグサは三重県産を用いた。一般的に食品として流通しているアオサ又はアオサノリはヒトエグサが原料になっており、三重県の生産量は全国生産量の 60% 以上を占めている。コンブは北海道の日高産、羅臼産及び道南産を用いた。コンブは全国生産量 32,500 t のうち、23,900 t を北海道が生産しており 74% を占めている [20]。ノリは宮城県、有明海及び瀬戸内海産を用いた。ノリの生産量を海区分で見ると、全国生産量 291,600 t のうち、有明海を含む東シナ海区が 156,400 t で 53%、次いで瀬戸内海区が 90,300 t で 31%、宮城県を含む北太平洋海区が 15,700 t で 5% を占めており、この 3 つの海区でノリの全国生産量の 90% が生産されて

いる [20]。ワカメは中国産、韓国産及び北海道産を用いた。ワカメの 2017 年の国内生産量は 3,575 t であるのに対して、輸入量は 23,215 t であり [21]、自給率は 13% 程度である。ヒジキは中国産、韓国産、三重県産、長崎県産及び千葉県産を用いた。ヒジキは現在の市場で流通しているものは国産品が 10~15% 程度であり、韓国、中国からの輸入品が大部分を占めている [22]。ヒジキの国内生産量は長崎県、千葉県、三重県の順に多く、この 3 県で全体の 58% を占めている [23]。

合計 15 種類の海藻を入手し、それぞれ岩谷産業株式会社製のミルサー IFM-800 を用いて粉碎し、均質化したものを検討用の海藻試料とした。海藻試料の一覧を表 1-1 に示す。

1.2.1.3 コメ

平成 28 年又は平成 29 年に愛知県、岐阜県及び三重県で収穫された市販の精米を購入して本研究に用いた。東海三県の平成 29 年のコメの生産量は、愛知県が 27,500 t、全国割合 1.8% で 20 位、三重県が 27,400 t、全国割合 1.7% で 21 位、岐阜県が 21,900 t、全国割合 1.4% で 26 位となっており、農業地域区分で見ると、東海地域は全国割合 5.9% で 10 区分中 8 位である [24]。東海三県のコメの生産量は、全国的に見れば多くはないが、これまでヒ素化合物の含有量に関する研究、調査において特別に対象の地域とされることが少なく、地元の農作物の実態を把握し、安全性の適切な評価につながることを期待して、本研究の試料に選定した。

合計 14 種類のコメを入手し、それぞれ岩谷産業株式会社製のミルサー IFM-800 を用いて粉碎し、均質化したものを検討用のコメ試料とした。コメ試料の一覧を表 1-2 に示す。

1.2.2 試薬及び標準物質

1.2.2.1 試薬

IC の移動相には、関東化学株式会社製の炭酸アンモニウム(試薬特級)を水に溶解して調製した 10 mmol/L 及び 200 mmol/L 炭酸アンモニウム溶液を用いた。移動相の pH は、キシダ化学株式会社製の 28% アンモニア水(試薬特級)を用いて調整した。総ヒ素定量試験の酸分解、ヒ素化合物の形態別定量試験の抽出及び各試験溶液の調製には、関東化学株式会社製の硝酸(超高純度試薬)、過酸化水素水(超高純度試薬)及び酢酸(超高純度試薬)を用いた。

試薬、試液、標準溶液及び試験溶液の調製には、ADVANTEC社製の蒸留水製造装置アクエリアス RFD240NA で製造した蒸留水を用いた。

1.2.2.2 標準物質

本研究では海藻及びコメに含まれるヒ素化合物のうち、含有量が多く、生物体内の一連の代謝経路で変換される As 、 As 、MMA 及び DMA 並びに海藻中の含有量が多いことが知られている AsB の合計 5 種類のヒ素化合物を測定対象とした。 As は関東化学株式会社製のヒ素標準液(化学分析用)を用いた。MMA は株式会社ワコーケミカル社製のものを用いた。 As 、DMA 及び AsB は国立研究開発法人産業技術総合研究所のヒ酸水溶液(NMIJ CRM 7912-a)、ジメチルアルシン酸水溶液(NMIJ CRM 7913-a)及びアルセノベタイン水溶液(NMIJ CRM 7901-a)を用いた。これらのヒ素化合物の標準物質を混合し、0.15 mol/L 硝酸で希釈して 1 μ gAs/mL の混合標準溶液を調製した。

内部標準溶液として、Merck社製のテルリウム ICP 標準液(1000 mg/L)を用いた。総ヒ素の定量試験では、これを 0.15 mol/L 硝酸を用いてテルリウム濃度が 10 mg/L になるように希釈した Te 内部標準溶液を試験溶液に加えた後、定容した。

1.2.3 装置

1.2.3.1 IC

IC には、Thermo Fisher Scientific社製の Dionex ICS-5000+イオンクロマトグラフィシステムを用いた。ヒ素化合物を化学種ごとに分離するカラムには、陰イオン交換樹脂を充填した Thermo Fisher Scientific社製の Dionex IonPac AS7(4 mm i.d. \times 250 mm)を用いた。

1.2.3.2 ICP-MS

ICP-MS には、Thermo Fisher Scientific社製の X シリーズ 2 を用いた。ヒ素の検出は $m/z=75$ で行い、 $^{40}Ar^{35}Cl$ の干渉を低減するため、コリジョンガスとしてヘリウムを用いて測定した。ヒ素化合物の形態別定量分析を行う際は、フッ素樹脂製チューブを用いて IC のカラムの出口を ICP-MS のネプライザーに接続し、カラムからの溶出液を直接 ICP-MS に導入した。

1.2.3.3 加熱処理装置

総ヒ素の定量試験に供する溶液の調製には、Milestone 社製のマイクロ波試料前処理装置 ETHOS UP を用いた。ヒ素化合物の形態別定量試験に供する溶液の抽出には、PerkinElmer 社製のブロックヒーター-SPB 酸分解システムを用いた。分解容器には SCP Science 社製のポリプロピレン製チューブ DigiTUBEs を用いた。

1.2.4 試験方法

1.2.4.1 試験法の妥当性評価

海藻及びコメのヒ素化合物の形態別定量試験法の妥当性評価の方法は、金属試験妥当性評価ガイドラインを参考にした。試験法の真度は、標準ひじき及び標準玄米の定量値とそれぞれの認証標準物質に付与されている認証値の比から求めた。試験法の精度は、分析者 1 名が認証標準物質についてそれぞれ 1 日 2 併行(N2)を 5 日間(J5)分析する枝分かれ実験の計画(図 1-1)に基づき、標準ひじき及び標準玄米を繰り返し試験して得られた定量値の標準偏差及び相対標準偏差を求め、N2-J5 の一元配置分散分析により併行精度及び室内精度を求めた。試験法の妥当性があると判断する基準は、金属試験妥当性評価ガイドラインの目標値である真度 80 ~ 110%、併行精度 10% 未満、室内精度 15% 未満とした。

定量下限は、コメ試料の抽出方法と同様に処理した空試験溶液を 10 回繰り返し測定し、得られた結果の標準偏差の 10 倍の値を試験操作上の定量下限とした。なお、試験工程の多いコメ試料の抽出法の定量下限を、海藻試料の定量下限に適用した。ただし、海藻及びコメはヒ素化合物の含有量が他の食品と比べて多く、iAs についても検出されることが予想されたため、検量線標準溶液の下限濃度は、便宜上、1 ngAs/mL とした。

1.2.4.2 総ヒ素の定量方法

ヒトエグサ、コンブ、ノリ、ヒジキ及びワカメの試料粉末 0.2 ~ 0.4 g、コメの試料粉末 0.3 ~ 0.6 g をそれぞれポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 製分解容器に正確に量り取った。これに硝酸 6 mL 及び過酸化水素水 2 mL を添加してよくなじませた後、マイクロ波試料前処理装置で表 1-3 に示す条件にて分解処理を行った。放冷後、分解液をポリエチレン (PP) 製チューブに移し、酢酸 1 mL 及び Te 内部標準溶液 0.5 mL を添加して、水で 50 mL に定容した。この液の一部を 0.45 μ m の親水

性 PTFE 製メンブランフィルターを装着したシリンジフィルターでろ過を行い試験溶液とした。調製した試験溶液を ICP-MS で測定し、各試料中の総ヒ素含有量を算出した。試験操作のフローチャートを図 1-2、ICP-MS の測定条件を表 1-4 に示す。

1.2.4.3 海藻試料のヒ素化合物の抽出方法

海藻試料からヒ素化合物を抽出する方法は、Hamano-Nagaoka [11]らの方法を参考にした。海藻試料 0.1 g を PP 製チューブに正確に量り取り、0.15 mol/L 硝酸 4 mL を添加して試料とよくなじませた。PP 製チューブにゆるく蓋をして、80 のブロックヒーターで 60 分間加熱抽出した。放冷後、水 16 mL を加えてよく振り混ぜ、ヒ素化合物の含有量に応じて適宜希釈した後、上澄みの一部を 0.45 μm のシリンジフィルターでろ過を行い試験溶液とした。試験操作のフローチャートを図 1-3 に示す。

1.2.4.4 コメ試料のヒ素化合物の抽出方法

コメ試料からヒ素化合物を抽出する方法は、独立行政法人農業環境技術研究所の方法 [25]を参考にした。コメ試料 1 g を PP 製チューブに正確に量り取り、0.15 mol/L 硝酸 4 mL を添加して試料とよくなじませた。PP 製チューブにゆるく蓋をして、110 のブロックヒーターで 2 時間加熱しながら抽出した。放冷後、水 4 mL を添加して穏やかに撹拌した。これを遠心分離し、上澄みを別の PP 製チューブに移した。残渣に水 4 mL を添加して撹拌した後、遠心分離して上澄みを先の液と合わせた。この操作をさらに 1 回行い、合わせた液を水で 20 mL に定容した。この液の一部を 0.45 μm のシリンジフィルターでろ過を行い試験溶液とした。試験操作のフローチャートを図 1-4 に示す。

1.2.4.5 IC/ICP-MS によるヒ素化合物の形態別定量

ヒ素化合物の形態別定量試験用に調製した試験溶液を IC/ICP-MS に供した。IC の移動相はアンモニア水で pH を 10 に調整した 10 mmol/L 及び 200 mmol/L 炭酸アンモニウム溶液を用い、10 mmol/L から 200 mmol/L のリニアグラジエントによりヒ素化合物の分離を行った。As^{III}、As^V、MMA、DMA 及び AsB を混合した水溶液を、それぞれの濃度が 1、2、5、10、20、50、100 ngAs/mL になるように希釈し、同様に

IC/ICP-MS に供して作成した検量線により、試験溶液中の各化学種の含有量を定量した。IC/ICP-MS の測定条件を表 1-5 に示す。

1.3 結果及び考察

1.3.1 試験法の妥当性評価

ヒ素化合物の混合標準溶液、標準ひじき及び標準玄米から抽出した試験溶液の IC/ICP-MS のクロマトグラムを図 1-5 に示す。混合標準溶液を測定したクロマトグラムでは、5 種類のヒ素化合物は良好な分離が確認でき、十分に定量試験ができると判断した。認証標準物質の測定においては、測定対象とした 5 種類のヒ素化合物のピークの近傍には夾雑物などのピークは認められず、海藻及びコメのマトリクス成分においては定量を妨害するものは無いと判断した。これらの結果から、本試験法は海藻及びコメのヒ素化合物の形態別定量試験法として高い選択性を有していると考えた。定量下限は、試験溶液濃度として iAs は 0.578 ngAs/mL、MMA は 0.129 ngAs/mL、DMA は 0.161 ngAs/mL、AsB は 0.248 ngAs/mL であった。

検量線は 1 ~ 100 ngAs/mL の範囲で良好な直線性を示した。また、測定機器の安定性については、検量線標準溶液の測定後、62 試験溶液をおよそ 16 時間かけて測定した直後に 50 ngAs/mL 混合標準溶液を測定したところ、それぞれのヒ素化合物の測定値は設定値に対して iAs は 107%、MMA は 109%、DMA は 107%、AsB は 107% となり、測定機器の感度変動として許容できる範囲であると判断した(表 1-6)。

妥当性評価のための枝分かれ実験計画に基づき収集したデータを解析した結果を表 1-7 に示す。標準ひじきのヒ素化合物の定量値は、認証されている As の認証値に対して 94.0% であった。標準玄米のヒ素化合物の定量値は、認証されている As₁ 及び As₂ の合計値に対して 90.1%、DMA の認証値に対して 98.6% であった。いずれの認証標準物質の定量値もそれぞれの認証値に対して良好な結果であり、金属試験妥当性評価ガイドラインの真度の目標値である 80 ~ 110% を満たす結果が得られた。N2-J5 の一元配置分散分析の結果は、標準ひじきは As の併行精度が 1.32%、室内精度が 2.77%、標準玄米は iAs の併行精度が 2.22%、室内精度が 2.47%、DMA の併行精度が 3.11%、室内精度が 3.13% であった。いずれの結果も、金属試験妥当性評価ガイドライ

ンの目標値である併行精度 10%未満及び室内精度 15%未満を満たす結果が得られた。

これらの結果から、海藻及びコメに含まれるヒ素化合物は、陰イオン交換カラムを用いることで、0.15 mol/L 硝酸を用いた加熱抽出で得られた抽出液を pH 調整することなく、組成が単純な移動相を用いた IC で、良好な分離ができることが分かった。また、定量値の精確さについても金属試験妥当性評価ガイドラインの目標値を満たしており、本試験法は海藻及びコメに含まれるヒ素化合物の形態別定量試験を行うのに十分な性能を有していると考えた。

1.3.2 海藻中のヒ素化合物の含有量

試験法の妥当性評価において、本試験法は海藻及びコメに含まれるヒ素化合物の含有量を評価するのに十分な性能を有していると判断した。ここではこの試験法を用いて、市販の海藻に含まれるヒ素化合物の含有量について調査を行った。海藻中のヒ素化合物の IC/ICP-MS のクロマトグラムを図 1-6、含有量を表 1-8 に示す。海藻はいずれも総ヒ素含有量が多く、特にヒジキは 100 mgAs/kg を超えるものがあった。その中で、ヒジキは iAs の含有量が多い。総ヒ素含有量に占める iAs の割合は、ヒジキ以外の海藻は 10%未満であるのに対し、ヒジキは低いもので 44%、大きいものでは 80%を超えており、ヒジキは特異的に iAs を多く含むことが分かった。ヒジキ以外の海藻は、有機ヒ素化合物の一つである AsB を多く含んでおり、総ヒ素含有量に占める AsB の割合は、80%以上であることが分かった。このように、海藻の種類によって iAs と有機ヒ素化合物の含有量の割合は大きく異なるが、本研究で定量した 5 種類のヒ素化合物の中では、As₁ 及び As₂ 並びに AsB が海藻の主要なヒ素化合物であり、簡便な操作で試験溶液を調製して測定できることが分かった。

1.3.3 コメ中のヒ素化合物の含有量

海藻と同様に、市販のコメに含まれるヒ素化合物の含有量について調査を行った。コメ中のヒ素化合物の IC/ICP-MS のクロマトグラムを図 1-7、含有量を表 1-9 に示す。コメは総ヒ素含有量に占める iAs の含有量の割合が高く、75%以上が iAs であった。有機ヒ素化合物は、含有量は少ないが、測定した有機ヒ素化合物のうち、DMA が検出された。東海三県で収穫されたコメの総ヒ素含有量は平均 0.196 mgAs/kg、iAs

の含有量は平均 0.171 mgAs/kg であり、総ヒ素含有量に占める iAs 化合物の割合は 87.2% であった。農林水産省が平成 24 年度に実施した国産玄米及び精米中のヒ素(総ヒ素・無機ヒ素)の含有実態調査 [26]によると、精米中の総ヒ素含有量の平均値は 0.14 mg/kg、最大値は 0.44 mg/kg、iAs 含有量の平均値は 0.12 mg/kg、最大値は 0.26 mg/kg であり、本研究で得られた東海三県の調査結果は全国平均と大差ないものであると考えた。

1.4 まとめ

本章では、食品に含まれるヒ素化合物の形態別定量試験法として、ヒ素化合物を多く含む海藻及びコメを試料として用い、簡便で精確な前処理及び測定方法の検討を行った。近年の報告で多く見られる逆相カラムを用いたヒ素化合物の分離方法は、イオン対試薬としてブタンスルホン酸ナトリウムが用いられるが、試験溶液の pH 調整が必要であるため操作が煩雑な上、ブタンスルホン酸ナトリウムは揮発性で長時間の連続測定では塩が析出し、測定に影響を与えることが懸念される。

一方、陰イオン交換カラムは、炭酸アンモニウム溶液を移動相とし、pH を 10 に調整することで As をカラムに保持させることができるようになり、ヒ素化合物の形態別定量に関して良好な結果が得られるとの報告がある [27]。本研究においても、陰イオン交換カラムを用いる条件で測定を行ったが、標準溶液と試料抽出液の pH などの液性を一致させれば、As₅ 及び As₃ 並びに MMA、DMA 及び AsB の 5 種類のヒ素化合物において良好な分離及び定量ができることが分かった。また、金属試験妥当性評価ガイドラインにある真度、併行精度及び室内精度の目標値を満たす結果が得られたことから、本試験法は海藻及びコメに含まれるヒ素化合物の形態別定量試験を行うのに十分な性能を有していると考えた。

この試験法を用いて、国内に流通する海藻及び米について、海藻は日本人の食卓でなじみのあるヒトエグサ(アオサ)、コンブ、ノリ、ワカメ及びヒジキを対象として代表的な産地のもの、米は東海地方で収穫されたものを購入し、ヒ素化合物の含有量の調査を行った。海藻は総ヒ素含有量が非常に多いが、海藻の種類によって iAs と有機ヒ素化合物の含有比率が大きく異なっていた。ヒジキは iAs の含有量が多い

のに対し、他の海藻はアルセノベタインの含有量が多かったことから、ヒジキのヒ素化合物の代謝経路は他の海藻とは異なることが推測された。米は、海藻に比べて総ヒ素含有量は少ないが、総ヒ素含有量に占める iAs の割合が高かった。

日本人にとってはいずれも摂食量の多い食材であり、有害な iAs を摂取し続けるリスクを抱えている。しかしながら、これらの食材は加工、調理法でヒ素化合物の含有量を減らすことができる [28] [29]。これまでに、日本人が通常の食生活において、ヒ素中毒になったという報告はなく、過剰な心配は必要ないと考えられる。それぞれの食材がどの程度のヒ素化合物を含んでいるかを把握し、適切に加工、調理して、バランスの良い食事を摂ることが重要であると考えられる。

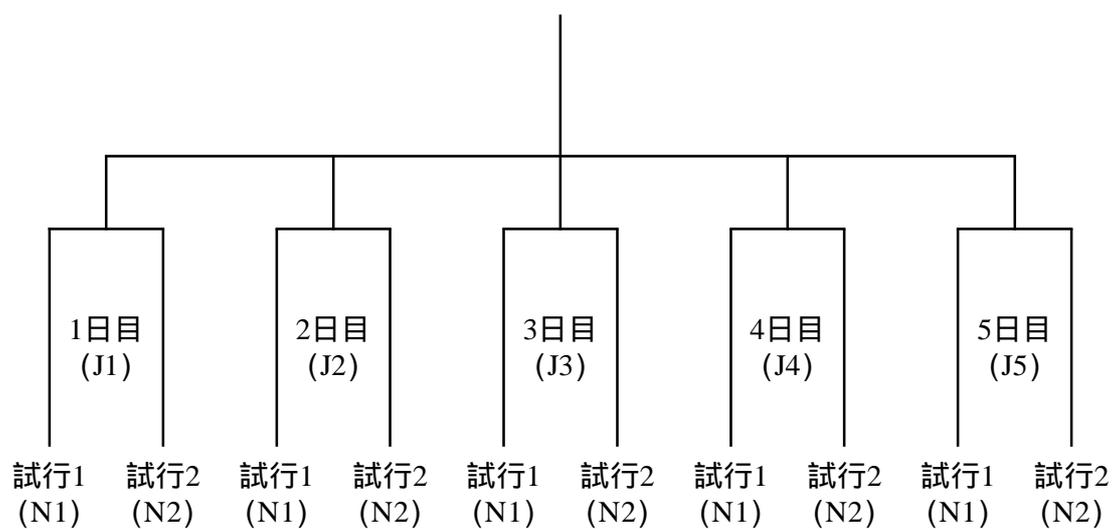


図1-1 ヒ素化合物の形態別定量試験法の妥当性評価の実験計画

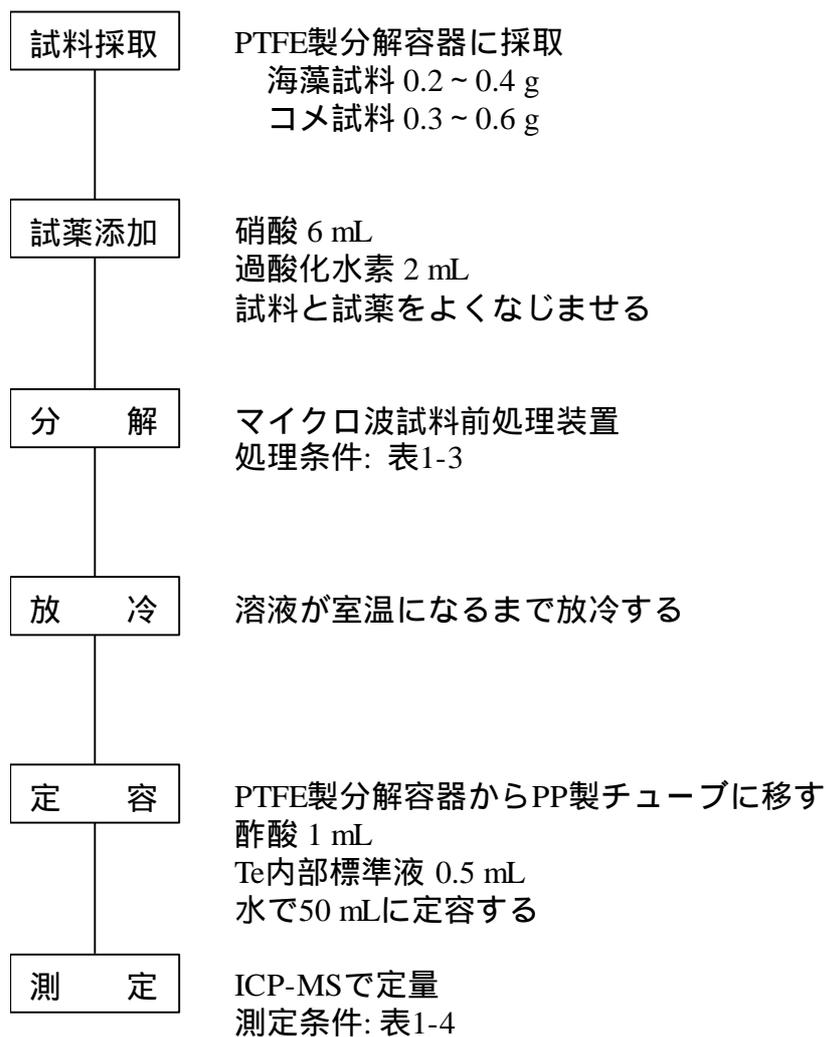


図1-2 総ヒ素の定量方法

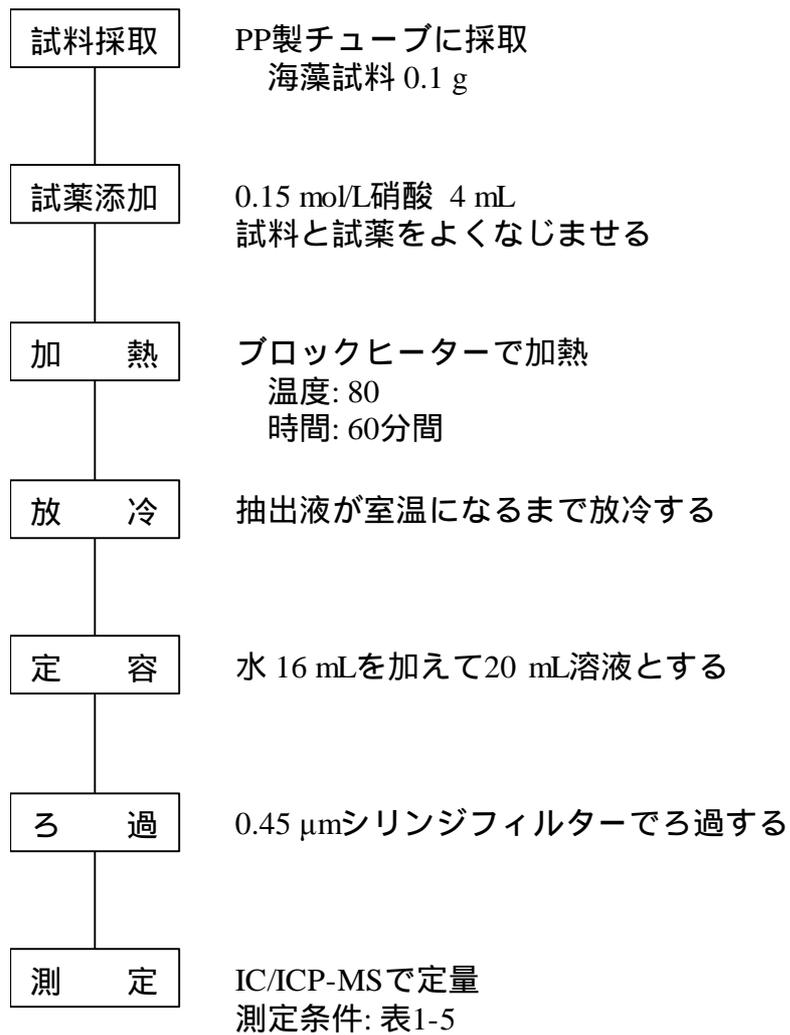


図1-3 海藻試料のヒ素化合物抽出方法

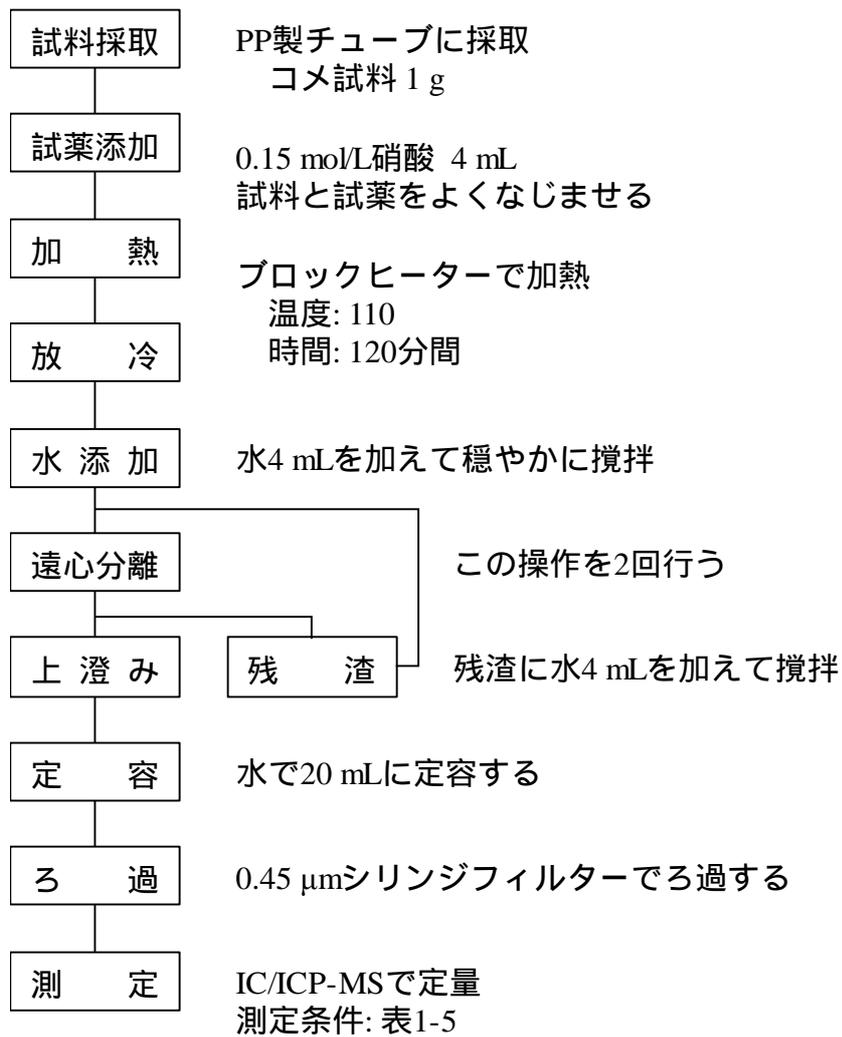


図1-4 コメ試料のヒ素化合物抽出方法

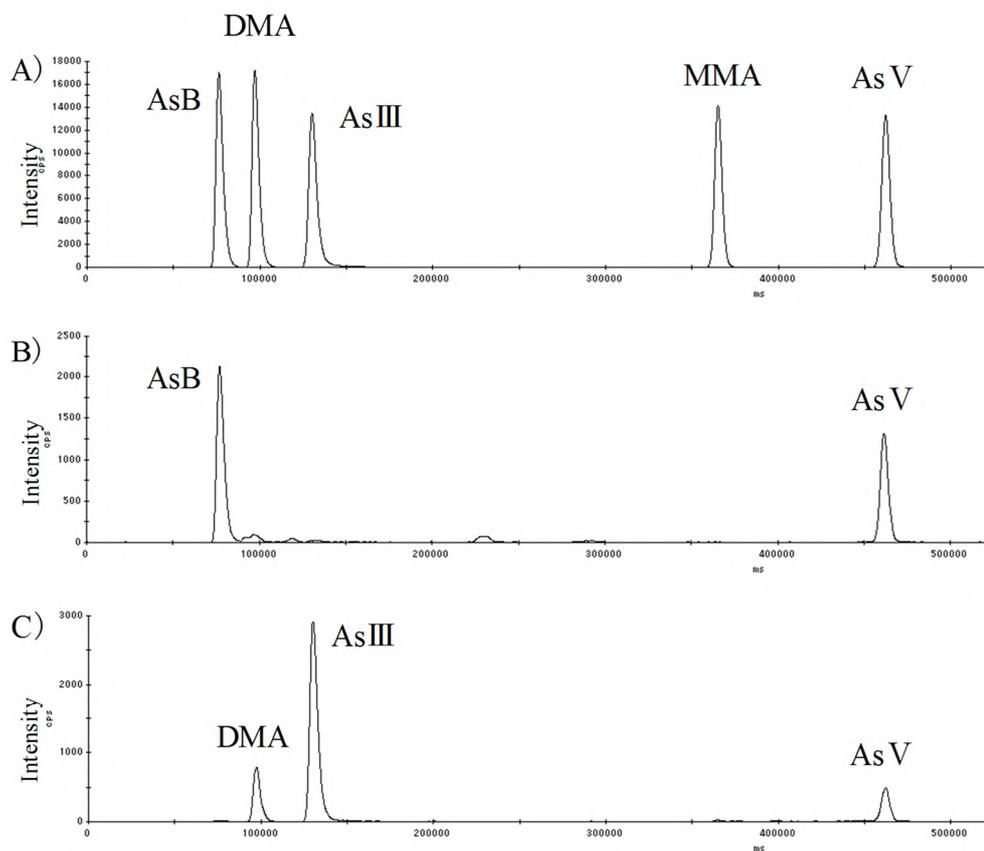


図1-5 IC/ICP-MSによるヒ素化合物の形態別定量試験のクロマトグラム
 A) ヒ素化合物混合標準液(100 ngAs/mL)
 B) NMIJ CRM 7405-a ひじき粉末
 C) NMIJ CRM 7533-a 玄米粉末

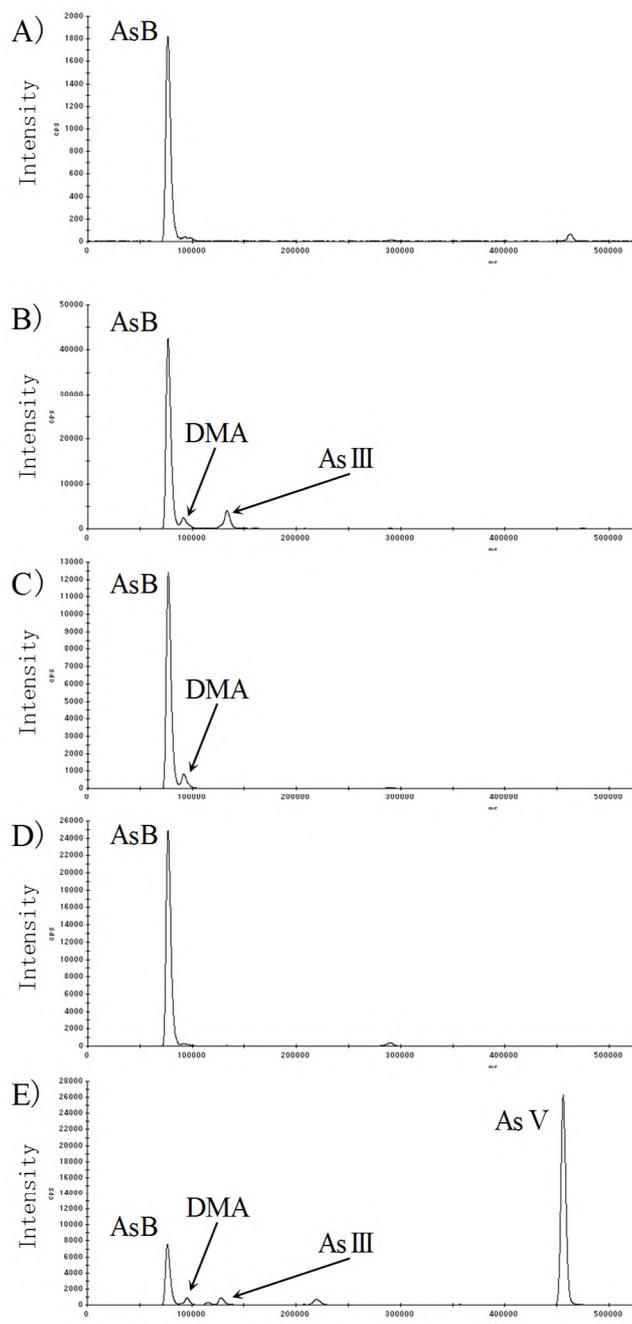


図1-6 市販の海藻中のヒ素化合物のクロマトグラムの一例

- A) ヒトエグサ (試料No.1)
- B) コンブ (試料No.2)
- C) ノリ (試料No.5)
- D) ワカメ (試料No.8)
- E) ヒジキ (試料No.11)

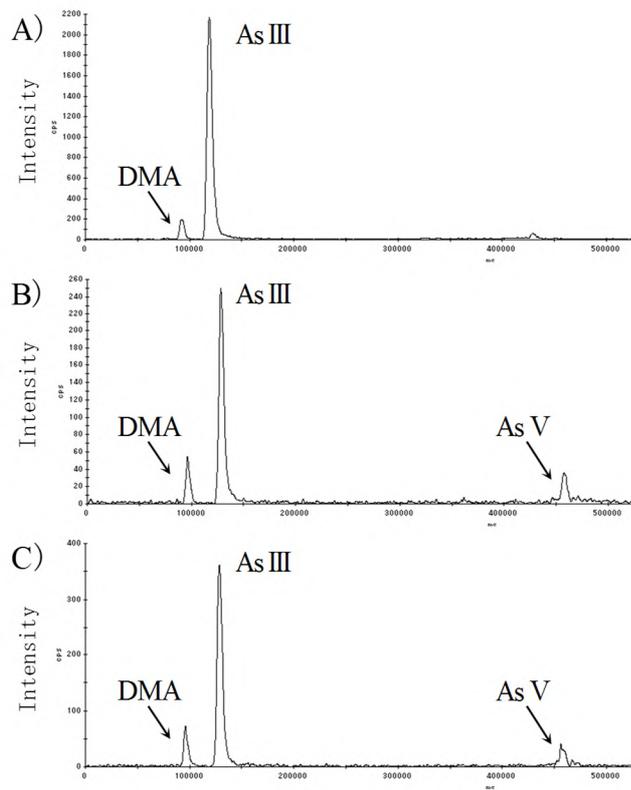


図1-7 市販のコメ中のヒ素化合物のクロマトグラムの一例
 A) 試料No.1 三重県産
 B) 試料No.9 愛知県産
 C) 試料No.12 岐阜県産

表1-1 検討用試料とした海藻

試料No.	種類	産地
1	ヒトエグサ	三重県 伊勢志摩
2	コンブ	北海道 日高
3	コンブ	北海道 羅臼
4	コンブ	北海道 道南
5	ノリ	宮城県
6	ノリ	有明海
7	ノリ	瀬戸内海
8	ワカメ	中国
9	ワカメ	韓国
10	ワカメ	北海道
11	ヒジキ	三重県 伊勢志摩
12	ヒジキ	長崎県
13	ヒジキ	千葉県 房総
14	ヒジキ	中国
15	ヒジキ	韓国

表1-2 検討用試料としたコメ

試料No.	産地	収穫年
1	三重県南部	平成29年
2	三重県松坂市周辺	平成29年
3	三重県津市北部	平成29年
4	三重県松坂市周辺	平成29年
5	三重県鈴鹿市周辺	平成29年
6	三重県伊賀市周辺	平成29年
7	三重県北勢地区	平成29年
8	三重県津市南部	平成29年
9	愛知県	平成28年
10	愛知県	平成28年
11	愛知県	平成28年
12	岐阜県	平成28年
13	岐阜県	平成28年
14	岐阜県	平成28年

表1-3 マイクロ波前処理装置の条件

ステップ	時間 (min.)	温度 ()	出力 (W)
1	0	0	0
2	2	50	1000
3	3	30	0
4	25	185	1000
5	1	155	0
6	19	185	1000

表1-4 ICP-MSの測定条件

装置	XSERIES 2
ネブライザーガス流量	アルゴン 0.82 L/min
補助ガス流量	アルゴン 0.80 L/min
プラズマガス流量	アルゴン 13.0 L/min
高周波出力	1400 W
コリジョンガス流量	ヘリウム/水素混合ガス 7.50 mL/min
測定質量数	⁷⁵ As

表1-5 IC/ICP-MSの測定条件

IC条件	
装置	Dionex ICS-5000 ⁺
カラム	Dionex IonPac AS7, (4 mm i.d. × 250 mm)
カラム温度	30
移動相	
溶液	A液: 10 mmol/L 炭酸アンモニウム B液: 200 mmol/L 炭酸アンモニウム
pH	10
流速	1.2 mL/min
勾配	0 min → 2 min, 100% A 2 min → 10 min, 100% B 10 min → 12 min, 100% B 12 min → 12.5 min, 100% A
導入量	25 μL
ICP-MS条件	
装置	XSERIES 2
ネブライザーガス流量	アルゴン 0.82 L/min
補助ガス流量	アルゴン 0.80 L/min
プラズマガス流量	アルゴン 13.0 L/min
高周波出力	1400 W
コリジョンガス流量	ヘリウム/水素混合ガス 7.50 mL/min
測定質量数	⁷⁵ As

表1-6 測定安定性評価

項目	iAs	MMA	DMA	AsB
検量線範囲 ngAs/mL	1, 2, 5, 10, 20, 50, 100			
検量線直線性 (r^2)	As : >0.999 As : >0.999	>0.999	>0.999	>0.999
安定性 %	107	109	107	107
定量下限 ngAs/mL ^{*1}	0.578	0.129	0.161	0.248

*1 試験溶液として

表1-7 枝分かれ実験の結果

認証の対象化学種	NMIJ CRM 7405-a	NMIJ CRM 7533-a	
	ひじき粉末	iAs	DMA
認証値 mg/kg	10.1 ± 0.5	0.530 ± 0.016	0.092 ± 0.004
定量値 mg/kg (n=10平均)	9.50	0.477	0.091
真度 %	94.0	90.1	98.8
併行精度 RSD%	1.32	2.22	2.70
室内精度 RSD%	2.77	2.47	3.00

表1-8 海藻試料のヒ素化合物の含有量

試料No.	試料*1	海藻試料中の濃度(mgAs/kg)				
		総ヒ素	iAs	MMA	DMA	AsB
1	ヒトエグサ	4.75	0.094	<0.02	0.030	2.26
2	コンブ	69.9	6.91	0.131	2.22	47.3
3	コンブ	60.2	4.41	0.055	13.5	45.5
4	コンブ	42.1	2.72	0.028	0.672	31.0
5	ノリ	17.2	0.022	<0.02	0.684	13.9
6	ノリ	23.6	0.014	<0.02	2.02	20.1
7	ノリ	18.3	0.497	<0.02	0.346	15.7
8	ワカメ	37.1	0.077	<0.02	0.175	26.9
9	ワカメ	38.5	0.046	0.023	0.377	28.5
10	ワカメ	29.3	0.754	0.037	0.625	20.4
11	ヒジキ	113	73.6	0.068	1.91	17.1
12	ヒジキ	154	119	0.046	1.09	12.1
13	ヒジキ	64.7	29.2	0.060	1.80	20.6
14	ヒジキ	81.1	50.8	0.020	2.43	10.5
15	ヒジキ	139	99.2	0.034	2.27	14.8

*1 産地は表1-1を記載

表1-9 コメ試料のヒ素化合物の含有量

試料No.	産地	コメ試料中の濃度 (mgAs/kg)				
		総ヒ素	iAs	AsB	DMA	MMA
1	三重県南部	0.175	0.153	<0.02	<0.02	<0.02
2	三重県松坂市周辺	0.265	0.208	<0.02	0.030	<0.02
3	三重県津市北部	0.162	0.141	<0.02	<0.02	<0.02
4	三重県松坂市周辺	0.360	0.302	<0.02	0.031	<0.02
5	三重県鈴鹿市周辺	0.194	0.150	<0.02	<0.02	<0.02
6	三重県伊賀市周辺	0.174	0.135	<0.02	<0.02	<0.02
7	三重県北勢地区	0.246	0.185	<0.02	0.030	<0.02
8	三重県津市南部	0.236	0.181	<0.02	0.025	<0.02
9	愛知県	0.100	0.087	<0.02	<0.02	<0.02
10	愛知県	0.246	0.199	<0.02	0.061	<0.02
11	愛知県	0.158	0.128	<0.02	0.049	<0.02
12	岐阜県	0.110	0.109	<0.02	<0.02	<0.02
13	岐阜県	0.150	0.099	<0.02	0.048	<0.02
14	岐阜県	0.166	0.135	<0.02	0.037	<0.02

第 2 章 IC/ICP-MS による柑橘類の果実のメチルアルソン酸定量試験法の検討

2.1 はじめに

ヒ素化合物は、1980 年代まではその毒性を利用して、農薬、殺鼠剤、防腐剤などとして使用され、環境中に放出されていた。現在、日本国内においては、農薬取締法に登録されていたヒ素化合物を含有する農薬は 1998 年に登録が失効しており、農薬として使用はされていない。諸外国においても、環境汚染の観点から有機ヒ素系農薬の市場流通が減少しているが、一部の農作物では使用が認められている国もある。米国では、米国環境保護庁が MMA の残留基準を、繊維を取っていない綿実 0.7 ppm、綿の外皮 0.9 ppm としている。また 2012 年までは、柑橘類の果実の MMA の残留基準は 0.35 ppm と定められていた。現在では柑橘類については、MMA は農薬ポジティブリストから除外されているが、リスク管理の観点から、MMA の不適切な使用が無いことを調べる試験要望が、現在でも続いている。

しかしながら、食品中に含まれるヒ素化合物の定量試験法は、様々な形態で存在するヒ素化合物を化学種ごとに測定するのではなく、硝酸などの酸化性試薬を用いて全て iAs に変換し、総ヒ素として評価する方法が一般的である。この方法では、定量されたヒ素が何に由来するものであるかの判断が困難であり、農薬として散布された有機ヒ素化合物であるか否かの区別はできなかった。また、総ヒ素の定量試験法は、前処理において硝酸、硫酸などの強酸を用いて加熱処理をするか、硝酸マグネシウムを添加して灰化処理を行うなど、危険で煩雑な操作を行わなければならない。

近年、ヒジキ及びコメについて、毒性の強い iAs を分別して定量する研究が盛んに行われている。第 1 章では、海藻及びコメを希硝酸中で加熱することで有機ヒ素化合物の化学形態を変化させずに抽出し、陰イオン交換カラムを用いた IC により化学種ごとに分離しながら連続して ICP-MS に導入し定量する試験法を検討した。この方法によって、iAs 以外にも MMA を含む複数の有機ヒ素化合物の定量が簡便に実施できるようになったことから、農薬として散布された MMA の定量試験法として適用できるのではないかと考えた。これまで農作物に含

まれるヒ素化合物の定量試験法は総ヒ素としての評価であったが、農薬として散布された MMA の定量試験法として形態別定量試験法が適用できれば、検出されたヒ素化合物の化学種から何に由来するヒ素であるかを推測し、食品としての安全性を適切に評価できるようになることを期待した。

そこで本章では、第 1 章で検討した IC/ICP-MS によるヒ素化合物の形態別定量試験法が、柑橘類の果実の MMA 定量試験法に適用できるか否か検討を行った。試験法の妥当性評価は「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知平成 19 年 11 月 15 日食案発第 1115001 号、以下「農薬試験妥当性評価ガイドライン」とする) [30]を参考に、本試験法の真度と精度を評価した。

2.2 実験

2.2.1 試料

三重県四日市市内のスーパーマーケットで購入した米国産オレンジ、米国産グレープフルーツ、メキシコ産ライム及び米国産レモンを本研究に用いた。

合計 4 種類の柑橘類について、それぞれ果実全体をソニック株式会社製のフードプロセッサ MK-K81 を用いて粉碎し、均質化したものを柑橘類試料とした(表 2-1)。

2.2.2 試薬及び標準物質

2.2.2.1 試薬

IC の移動相には、関東化学株式会社製の炭酸アンモニウム(試薬特級)を水に溶解して調製した 10 mmol/L 及び 200 mmol/L 炭酸アンモニウム溶液を用いた。移動相の pH は、キシダ化学株式会社製の 28% アンモニア水(試薬特級)を用いて調整した。試料の抽出及び試験溶液の調製には、関東化学株式会社製の硝酸(超高純度試薬)を用いた。

試薬、試液、標準溶液及び試験溶液の調製には、ADVANTEC 社製の蒸留水製造装置アクエリアス RFD240NA で製造した蒸留水を用いた。

2.2.2.2 標準物質

MMA の標準物質は株式会社ワコーケミカル社製のものを用いた。

MMA 標準物質を 0.15 mol/L 硝酸で希釈して、0.1 µgMMA/mL 標準溶液を調製した。

2.2.3 装置

2.2.3.1 IC

IC には、Thermo Fisher Scientific 社製の Dionex ICS-5000⁺イオンクロマトグラフィシステムを用いた。ヒ素化合物を分離するカラムには、陰イオン交換樹脂を充填した Thermo Fisher Scientific 社製の Dionex IonPac AS7(4 mm i.d. × 250 mm)を用いた。

2.2.3.2 ICP-MS

ICP-MS には、Thermo Fisher Scientific 社製の iCAP RQ ICP-MS を用いた。ヒ素の検出は $m/z=75$ で行い、 $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ の干渉を低減するため、コリジョンガスとしてヘリウムを用いて測定した。

2.2.3.3 加熱処理装置

MMA の定量試験に供する試験溶液の抽出には、PerkinElmer 社製のブロックヒーター-SPB 酸分解システムを用いた。分解容器には SCP Science 社製の PP 製チューブ DigiTUBEs を用いた。

2.2.4 試験方法

2.2.4.1 試験法の妥当性評価

柑橘類の果実の MMA 定量試験法の妥当性評価の方法は農薬試験妥当性評価ガイドラインを参考にした。試験法の真度は、MMA 濃度が 0.01 ppm 相当となるように MMA 標準溶液を添加した試料(以下「MMA 添加試料」とする)を本試験法で定量し、得られた定量値の平均値の添加濃度に対する比を求めた回収率を真度として評価した。試験法の精度は、分析者 1 名が MMA 添加試料についてそれぞれ 1 日 2 併行(N2)を 5 日間(J5)分析する枝分かれ実験の計画(図 2-1)に基づき、繰り返し試験して得られた回収率の値の標準偏差及び相対標準偏差を求め、N2-J5 の一元配置分散分析により併行精度及び室内精度を求めた。試験法の妥当性があると判断する基準は、農薬試験妥当性評価ガイドラインの目標値である真度 70 ~ 120%、併行精度 25% 未満、室内精度 30% 未満とした。

MMA 定量試験法の定量下限は、食品衛生法(昭和 23 年法律第 233

号)第 11 条第 3 項におけるいわゆる一律基準である 0.01 ppm を目標値とした。この定量下限が確保できること確認するため、MMA 添加試料を IC/ICP-MS で測定し、得られたクロマトグラムにおいて定量下限に対応するピークが S/N 10 であることを確認した。

2.2.4.2 試験溶液の調製

柑橘類試料から MMA を抽出する方法は、本論文第 1 章 1.2.4.3 海藻中のヒ素化合物の抽出方法を参考にした。オレンジ、グレープフルーツ、ライム及びレモンの果実全体をフードプロセッサーで粉砕し均質化した柑橘類試料 1 g を PP 製チューブに正確に量り取り、0.15 mol/L 硝酸 4 mL を添加して試料とよくなじませた。PP 製チューブにゆるく蓋をして、80 のブロックヒーターで 60 分間加熱抽出した。放冷後、水を加えて 20 mL に定容し、よく振り混ぜた後、静置した上澄みの一部を 0.45 μm のシリンジフィルターでろ過を行い試験溶液とした。別に、柑橘類試料 1 g を PP 製チューブに正確に量り取り、0.1 $\mu\text{gMMA/mL}$ 標準溶液 100 μL を添加した後 30 分間静置した MMA 添加試料について、同様の抽出操作により MMA 添加試験溶液を調製した。試験操作のフローチャートを図 2-2 に示す。

2.2.4.3 IC/ICP-MS による MMA の定量

柑橘類試料から抽出した試験溶液及び MMA 添加試験溶液を IC/ICP-MS に供した。IC の移動相はアンモニア水で pH を 10 に調整した 10 mmol/L 及び 200 mmol/L 炭酸アンモニウム溶液を用い、10 mmol/L から 200 mmol/L のリニアグラジエントにより MMA の分離を行った。MMA 標準溶液を、濃度が 0.5、1、2、5 ng/mL となるように希釈し、同様に IC/ICP-MS に供して作成した検量線により、試験溶液及び MMA 添加試験溶液中の MMA の含有量を定量した。IC/ICP-MS の測定条件を表 2-2 に示す。

2.3 結果及び考察

柑橘類試料より抽出した試験溶液及び MMA 添加試験溶液の IC/ICP-MS のクロマトグラムを図 2-3 ~ 図 2-6 に示す。いずれのクロマトグラムにおいても、MMA のピークの近傍には夾雑物などのピークは認められず、柑橘類のマトリクス成分においては MMA の定量を妨害

するものは無いと判断した。また、MMA 添加試験溶液のクロマトグラムにおいて、MMA のピーク高さがベースラインノイズの 10 倍以上であることが明らかであったことから、本試験法の定量下限は 0.01 ppm に設定できると判断した。検量線は 0.5 ~ 5 ng/mL の範囲において良好な直線性を示した。各測定日の最後に 5 ng/mL MMA 標準溶液を測定したところ、測定値は設定値に対して 90% 以上の定量値となり、測定機器の感度変動として許容できる範囲であると判断した(表 2-3)。

妥当性評価のための枝分かれ実験計画に基づき収集したデータを解析した結果を表 2-4 に示す。オレンジは真度が 93.1%、併行精度が 3.5%、室内精度が 8.7%であった。グレープフルーツは真度が 92.2%、併行精度が 4.0%、室内精度が 9.6%であった。ライムは真度が 92.1%、併行精度が 4.2%、室内精度が 9.3%であった。レモンは真度が 91.3%、併行精度が 7.8%、室内精度が 9.9%であった。全ての柑橘類試料において、農薬妥当性評価ガイドラインの目標値である真度 70 ~ 120%、併行精度 25% 未満、室内精度 30% 未満を満たす結果が得られた。

これらの結果から、柑橘類の果実の MMA は、陰イオン交換カラムを用いることで、0.15 mol/L 硝酸を用いた加熱抽出で得られた抽出液を pH 調整することなく、組成が単純な移動相を用いた IC で良好な分離ができることが分かった。また、定量値の精確さについても農薬試験妥当性評価ガイドラインの目標値を満たしており、測定の安定性も良好な結果が得られたことから、本試験法は柑橘類の果実の MMA 定量試験を行うのに十分な性能を有していると考えた。

2.4 まとめ

本章では、柑橘類の果実の MMA 定量試験法として、第 1 章で検討した IC/ICP-MS によるヒ素化合物の形態別定量試験法が適用できるか否かの検討を行った。

オレンジ、グレープフルーツ、ライム及びレモンを柑橘類の代表として検討に用い、農薬試験妥当性評価ガイドラインを参考に試験法の妥当性評価を行ったところ、真度、併行精度及び室内精度においていずれも目標値を満たす良好な結果が得られた。このことから、これまでの総ヒ素としての評価ではなく、ヒ素化合物を化学種ごとに分別して定量することが可能となり、分析した柑橘類の果実に対して MMA が使用された可能性があるか又は残留している可能性があるかの判定

をより適切に行うことができるようになったと考えた。

また、総ヒ素の定量試験法では危険で煩雑な操作を行う必要があったが、本試験法は希硝酸を用いて比較的低温な 80 の加熱でヒ素化合物の抽出が可能であることから、簡便で安全性の高い試験法であるといえる。

これらの結果から、本試験法は柑橘類の果実の MMA 試験法として、有効な方法の一つであると考えられる。

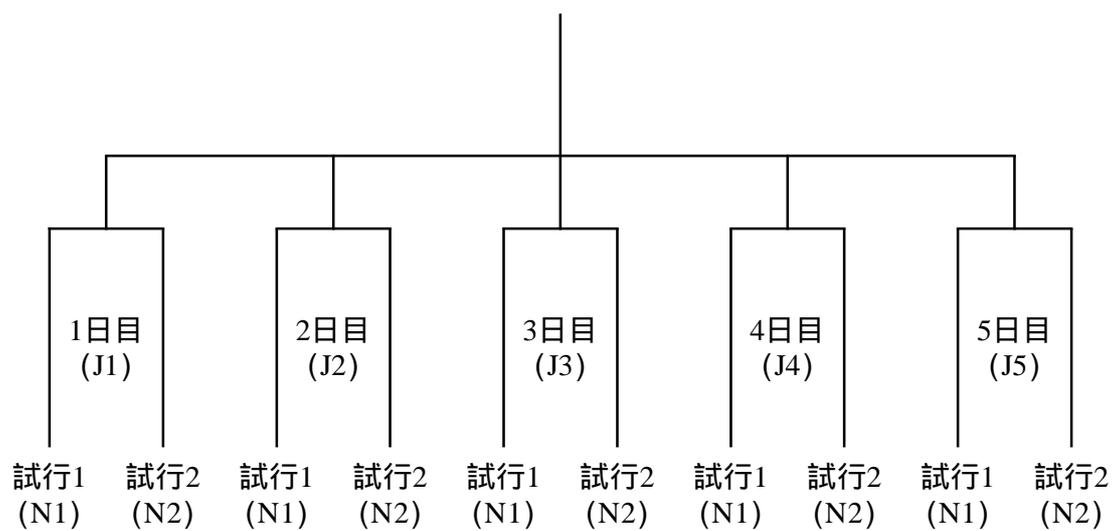


図2-1 MMA定量試験法の妥当性評価の実験計画

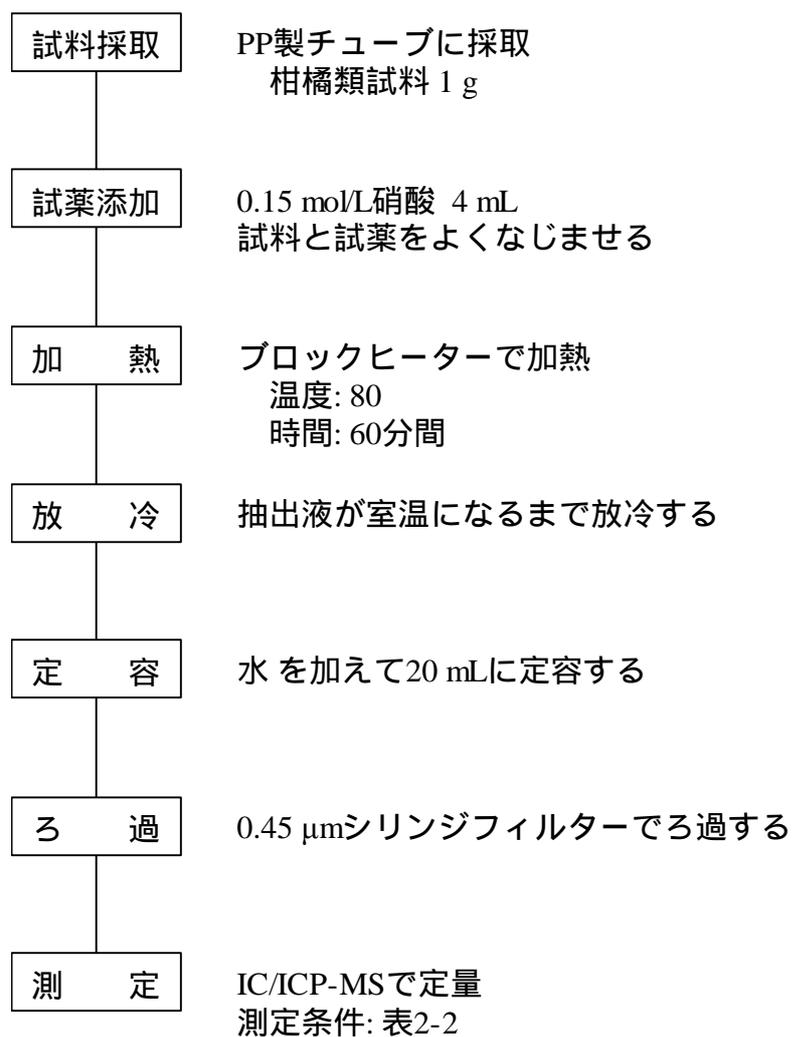


図2-2 柑橘類試料のMMA抽出方法

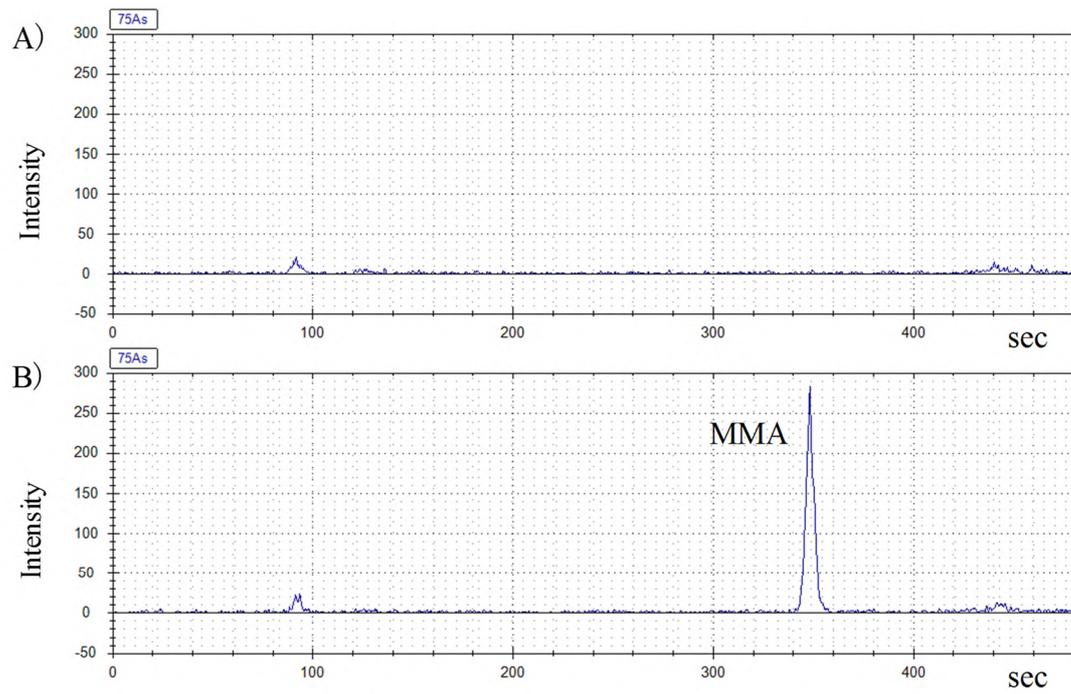


図2-3 オレンジから抽出した試験溶液のクロマトグラム

A) 試料溶液

B) MMA添加試料溶液

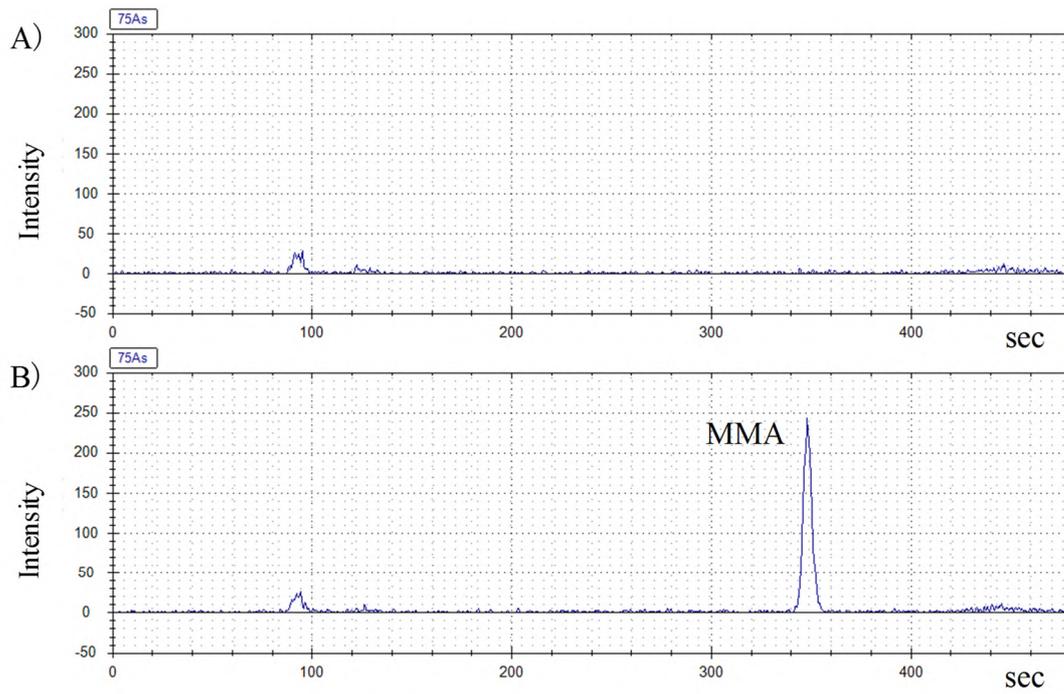


図2-4 グレープフルーツから抽出した試験溶液のクロマトグラム
 A) 試料溶液
 B) MMA添加試料溶液

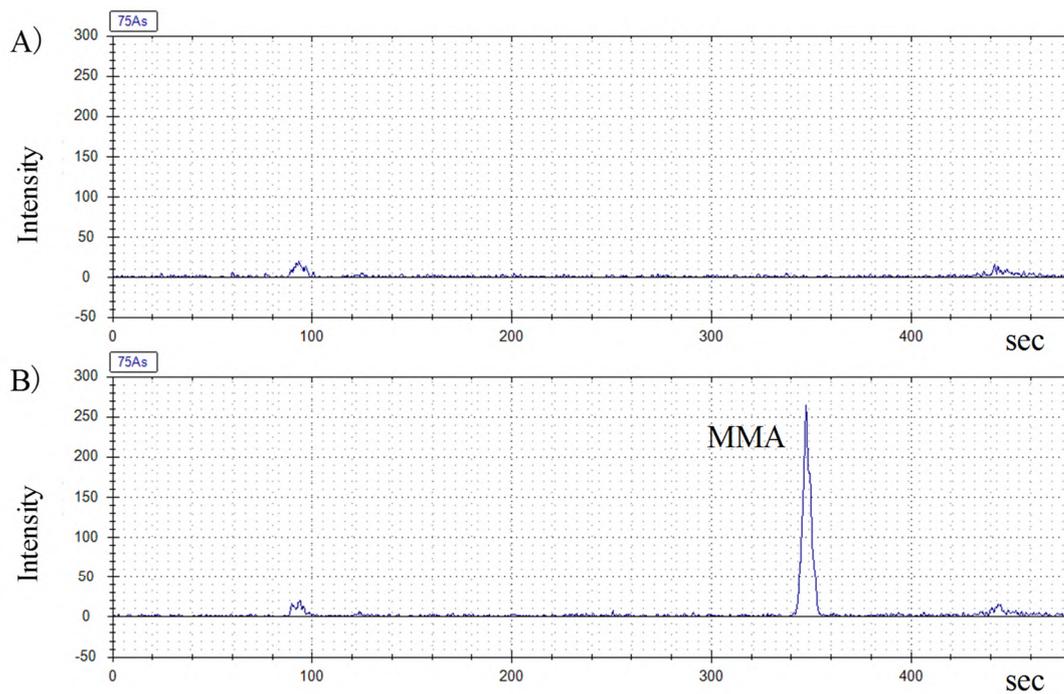


図2-5 ライムから抽出した試験溶液のクロマトグラム

A) 試料溶液

B) MMA添加試料溶液

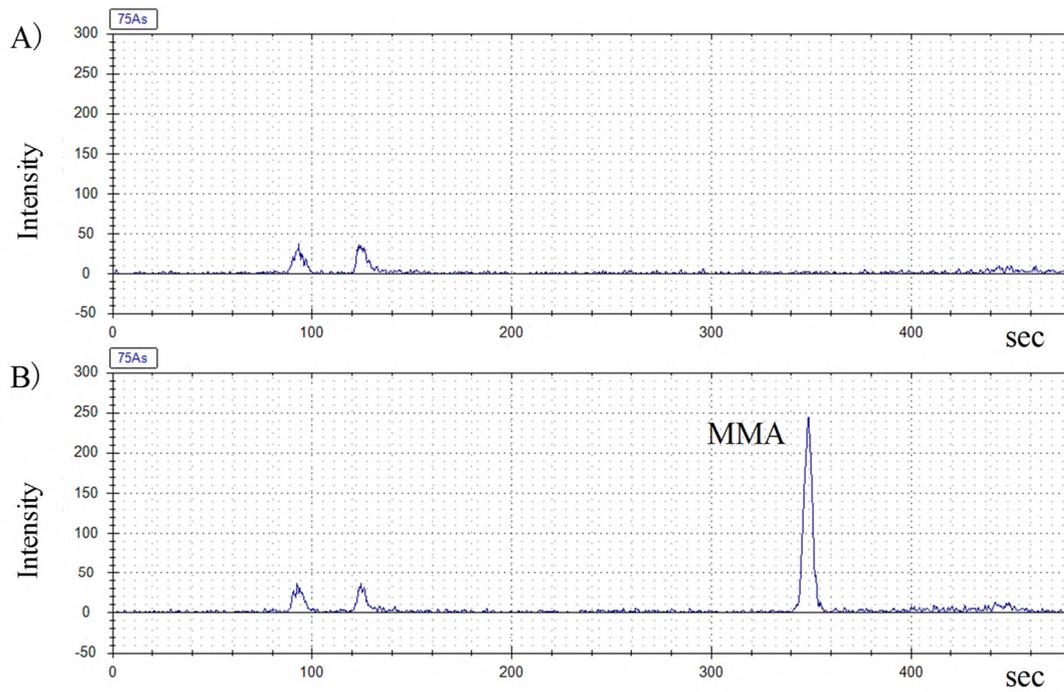


図2-6 レモンから抽出した試験溶液のクロマトグラム

A) 試料溶液

B) MMA添加試料溶液

表2-1 検討用試料とした柑橘類

試料No.	種類	産地
1	オレンジ	米国
2	グレープフルーツ	米国
3	ライム	メキシコ
4	レモン	米国

表2-2 IC/ICP-MSの測定条件

IC条件	
装置	Dionex ICS-5000 ⁺
カラム	Dionex IonPac AS7, (4 mm i.d. × 250 mm)
カラム温度	30
移動相	
溶液	A液: 10 mmol/L 炭酸アンモニウム B液: 200 mmol/L 炭酸アンモニウム
pH	10
流速	1.2 mL/min
勾配	0 min → 2 min, 100% A 2 min → 10 min, 100% B 10 min → 12 min, 100% B 12 min → 12.5 min, 100% A
導入量	25 μL
ICP-MS条件	
装置	iCAP RQ ICP-MS
ネブライザーガス流量	アルゴン 1.054 L/min
補助ガス流量	アルゴン 0.80 L/min
プラズマガス流量	アルゴン 14 L/min
高周波出力	1550 W
コリジョンガス流量	ヘリウム/水素混合ガス 5.075 mL/min
測定質量数	⁷⁵ As

表2-3 測定 of 安定性評価

項目	評価
検量線範囲 ngMMA/mL	0.5, 1, 2, 5
検量線直線性 (r^2)	>0.999
安定性 %	>90
定量下限*1 ngMMA/mL	0.5>

*1 試験溶液として

表2-4 枝分かれ実験の結果

	柑橘類試料			
	オレンジ	グレープ フルーツ	ライム	レモン
真度%(n=10平均)	93.1	92.2	92.1	91.3
併行精度 RSD%	3.5	4.0	4.2	7.8
室内精度 RSD%	8.7	9.6	9.3	9.9

第3章 IC/ICP-MS によるペットフード中の無機ヒ素化合物の定量試験法の検討

3.1 はじめに

愛玩動物用飼料(ペットフード)の安全性の確保を図るため、平成21年6月1日から環境省と農林水産省の共管による「愛がん動物用飼料の安全性の確保に関する法律」(平成20年法律第83号、通称：ペットフード安全法) [31]が施行された。この法律により、国は安全なペットフードのために、成分規格、製造の方法の基準、表示の基準・規格などを定め、事業者はこの法律を遵守して製造・輸入・販売を行っている。この中で、成分規格について、愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令(平成21年4月28日農林水産省令・環境省令第1号) [32]により、添加物、農薬、汚染物質などに上限値が定められており(表3-1)、また、農林水産省はペットフード関連事業者に対して立入検査を実施し、集取した愛玩動物用飼料について試験をしてその結果を公表している。立入検査に係る試験結果については、独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC)のwebサイトにおいても閲覧が可能である [33]。平成27年8月から平成30年7月までの3年間において、成分規格を違反したものは、猫用ペットフードの総ヒ素含有量が上限値である15 $\mu\text{g/g}$ を超過する17 $\mu\text{g/g}$ 検出された1件であったが、この猫用ペットフードにはかつお、まぐろが使用されており、総ヒ素が多く含まれる海産物を原材料にしたものであった。犬猫が高濃度のヒ素を摂取し続けると、嘔吐や下痢などの症状を引き起こす可能性がある [34]。しかしながら、ヒジキを除く海産物の総ヒ素は、有毒なiAsの占める割合が非常に低いとの報告もある [2]。成分規格を違反となった猫用ペットフードについても、総ヒ素としてではなく、iAsとして試験を実施していれば、有毒なiAsの含有量は低く、安全性に問題はないという評価ができた可能性がある。

こうした背景の中で、ペットフード中の総ヒ素は基準の見直しが進められており、平成26年の農業資材審議会飼料分科会飼料安全部会において、iAsの分析法が普及した段階でiAsの基準を検討する方針が出され、平成30年4月23日にペットフード検査法が改正された際に、iAsの試験方法が収載された。基準値については、以前と同様、総ヒ素と

して15 µg/gが上限値として設定されているが、今後iAsとして基準値が設けられる可能性もある。

新たに収載されたiAs定量試験法の概要は、アルカリ溶液を用いてペットフードからヒ素化合物を抽出した後、イオン対逆相クロマトグラフィーにより化学種ごとに分離し、ICP-MSによりそれぞれの化学種ごとのヒ素化合物含有量を定量する方法である。この方法で懸念されるのは、イオン対試薬として移動相に用いるブタンスルホン酸ナトリウムの存在である。ICP-MSによる測定において、不揮発性成分である塩類を含む溶液の長時間の導入は、塩類の析出、検出器の汚染など測定の安定性を低下させ、装置への負荷が高い。

そこで本章では、第1章及び第2章で検討したIC/ICP-MSによるヒ素化合物の形態別定量試験法が、ペットフードのiAs定量試験法に適用できるか否かの検討を行った。これまでの研究で検討した方法がペットフードのiAs定量試験法においても適用ができれば、ICP-MSへの影響が少なく安定したiAsの定量が可能となることを期待した。試験法の妥当性評価は金属試験妥当性評価ガイドラインを参考に、本試験法の真度と精度を評価した。

3.2 実験

3.2.1 試料

市販の犬用ペットフードのうち、ペットフード検査法の適用範囲であるドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキーハードタイプ、素材乾燥ジャーキーソフトタイプ、ビスケット及び粉ミルクを購入して本研究に用いた。

合計8種類のペットフードを入手し、それぞれ岩谷産業株式会社製のミルサーIFM-800及びパナソニック株式会社製のフードプロセッサ-MK-K81を用いて粉碎し、均質化したものを検討用のペットフード試料とした。ペットフード試料の一覧を表3-2に、外観を写真3-1～3-8に示す。

3.2.2 試薬及び標準物質

3.2.2.1 試薬

ICの移動相には、関東化学株式会社製の炭酸アンモニウム(試薬特級)を水に溶解して調製した10 mmol/L及び200 mmol/L炭酸アンモニ

ウム溶液を用いた。移動相の pH は、キシダ化学株式会社製の 28% アンモニア水(試薬特級)を用いて調整した。

試料の抽出には多摩化学工業株式会社製 25w/v% 水酸化テトラメチルアンモニウム(以下「TMAH」とする)溶液を水で希釈して調製した 2w/v% TMAH 溶液を用いた。試験溶液の pH は、関東化学株式会社製の硝酸(超高純度試薬)を用いて調整した。pH 指示薬はチモールブルーを用いた。

試薬、試液、標準溶液及び試験溶液の調製には、ADVANTEC 社製の蒸留水製造装置アクエリアス RFD240NA で製造した蒸留水を用いた。

3.2.2.2 標準物質

As は関東化学株式会社製のヒ素標準液(化学分析用)を用いた。As は国立研究開発法人産業技術総合研究所のヒ酸水溶液(NMIJ CRM 7912-a)を用いた。これらのヒ素化合物の標準物質を混合し、0.15 mol/L 硝酸で希釈して、As³⁺ 及び As⁵⁺ の濃度がそれぞれ 1 µgAs/mL の iAs 混合標準溶液を調製した。

3.2.3 装置

3.2.3.1 IC

IC には、Thermo Fisher Scientific 社製の Dionex ICS-5000⁺イオンクロマトグラフィシステムを用いた。ヒ素化合物を分離するカラムには、陰イオン交換樹脂を充填した Thermo Fisher Scientific 社製の Dionex IonPac AS7(4 mm i.d. × 250 mm)を用いた。

3.2.3.2 ICP-MS

ICP-MS には、Thermo Fisher Scientific 社製の iCAP RQ ICP-MS を用いた。ヒ素の検出は m/z=75 で行い、⁴⁰Ar³⁵Cl の干渉を低減するため、コリジョンガスとしてヘリウムを用いて測定した。

3.2.3.3 加熱処理装置

iAs の定量試験に供する試験溶液の抽出には、PerkinElmer 社製のブロックヒーター SPB 酸分解システムを用いた。分解容器には SCP Science 社製の PP 製チューブ DigiTUBEs を用いた。

3.2.4 試験方法

3.2.4.1 試験法の妥当性評価

ペットフード中の iAs 定量試験法の妥当性評価の方法は、第 1 章と同様、金属試験妥当性評価ガイドラインを参考にした。試験法の真度は、As³⁺ 及び As⁵⁺ 濃度がそれぞれ 0.1 mgAs/kg 相当となるように iAs 混合標準溶液を添加した試料(以下「iAs 添加試料」とする)を本試験法で定量し、得られた定量値の平均値の添加濃度に対する比を求めた回収率を真度として評価した。試験法の精度は、分析者 1 名が iAs 添加試料についてそれぞれ 1 日 2 併行(N2)を 5 日間(J5)分析する枝分かれ実験の計画(図 3-1)に基づき、繰り返し試験して得られた回収率の値の標準偏差及び相対標準偏差を求め、N2-J5 の一元配置分散分析により併行精度及び室内精度を求めた。試験法の妥当性があると判断する基準は、金属試験妥当性評価ガイドラインの目標値である真度 80~110%、併行精度 10% 未満、室内精度 15% 未満とした。

iAs 定量試験法の定量下限については、ペットフード検査法の分析法バリデーションにおいて、As³⁺ 及び As⁵⁺ それぞれ 0.1 mgAs/kg と設定されていることから、本研究においても As³⁺ 及び As⁵⁺ それぞれ 0.1 mgAs/kg を目標値とした。この定量下限が確保できること確認するため、iAs 添加試料を IC/ICP-MS で測定し、得られたクロマトグラムにおいて定量下限に対応するピークが S/N 10であることを確認した。

3.2.4.2 試験溶液の調製

ペットフード試料から iAs を抽出する方法は、ペットフード検査法の「第 4 章 重金属等 4 砒素 4.1 無機砒素の液体クロマトグラフ - 誘導結合プラズマ質量分析計による分析法 B 定量抽出」を参考にした。第 1 章及び第 2 章において、ヒ素化合物の抽出には 0.15 mol/L 硝酸を用いていたが、ジャーキーなどの動物性の原材料を使用したペットフードが試験の適用範囲となっており、試料への浸潤性、たんぱく質の分解による抽出効率の良さを考慮し、ペットフード検査法にあるアルカリ溶液を用いた抽出を行った。ただし、本研究で使用した陰イオン交換カラム Dionex IonPac AS7 は、試験溶液の pH が高い場合、保持時間の短い AsB、DMA 及び As³⁺ の分離が不十分になるとの報告がある [35]。そこで、アルカリ溶液により抽出した液を硝酸で pH を約 1 に調整することとした。

均質化したペットフード試料 0.5 g を PP 製チューブに正確に量り取り、2w/v% TMAH 溶液 5 mL を添加して試料とよくなじませた。PP 製チューブにゆるく蓋をして、110 のブロックヒーターで 120 分間加熱抽出した。放冷後、0.1w/v% チモールブルーを数滴加え、0.15 mol/L 硝酸で pH を約 1(赤色)に調整した後、50 mL に定容した。この液の一部を 0.45 μm のシリンジフィルターでろ過を行い試験溶液とした。別に、ペットフード試料 0.5 g を PP 製チューブに正確に量り取り、1 $\mu\text{gAs/mL}$ の iAs 混合標準溶液 50 μL を添加した後 30 分間静置した iAs 添加試料について、同様の抽出操作により iAs 添加試験溶液を調製した。試験操作のフローチャートを図 3-2 に示す。

3.2.4.3 IC/ICP-MS による iAs の定量

ペットフード試料から抽出した試験溶液及び iAs 添加試験溶液を IC/ICP-MS に供した。IC の移動相はアンモニア水で pH を 10 に調整した 10 mmol/L 及び 200 mmol/L 炭酸アンモニウム溶液を用い、10 mmol/L から 200 mmol/L のリニアグラジエントによりヒ素化合物の分離を行った。iAs 混合標準溶液を、それぞれの濃度が 1、2、5 ngAs/mL になるように希釈し、同様に IC/ICP-MS に供して作成した検量線により、試験溶液及び iAs 添加試験溶液中の As₅ 及び As₃ の含有量を定量し、その合算値である iAs を算出した。IC/ICP-MS の測定条件を表 3-3 に示す。

3.3 結果及び考察

ペットフード試料より抽出した試験溶液及び iAs 添加試験溶液の IC/ICP-MS のクロマトグラムを図 3-3 ~ 図 3-10 に示す。ペットフード検査法の「第 4 章 重金属等 4 砒素 4.1 無機砒素の液体クロマトグラフ - 誘導結合プラズマ質量分析計による分析法」の注 1 に、「本法では、無機砒素()の多くが無機砒素()に酸化されるため、試料中の無機砒素量は、無機砒素()量及び無機砒素()の含量として定量する。」と記載されており、実際に本研究で測定したクロマトグラムにおいても、素材乾燥ジャーキーハードタイプ及びソフトタイプ以外のペットフード試料は、添加した As₃ 標準溶液のピークが縮小或いは消失し、その分が As₅ のピークに上乘せとなっていたが、素材乾燥ジャーキーハードタイプ及びソフトタイプについては As₃ のピークが縮小し、そ

の分が As のピークに上乘せになっていた。試料によって酸化還元反応に影響を及ぼす成分が含まれていることが推測されたが、本研究においては酸化還元反応に違いが生じる要因の特定までには至らなかった。しかしながら、いずれのクロマトグラムにおいても、As 及び As のピークの近傍には夾雑物などのピークは認められず、ペットフードのマトリクス成分においては iAs の定量を妨害するものは無いと判断した。また、iAs 添加試験溶液のクロマトグラムにおいて、As 及び As のピーク高さがベースラインノイズの 10 倍以上であることが明らかであったことから、本試験法の定量下限は 0.01 ppm に設定できると判断した。検量線は 1 ~ 5 ng/mL の範囲において良好な直線性を示した。各測定日の最後に 5 ng/mL iAs 混合標準溶液を測定したところ、測定値は設定値に対して 90% 以上の定量値となり、測定機器の感度変動として許容できる範囲であると判断した(表 3-4)。

妥当性評価のための枝分かれ実験計画に基づき収集したデータを解析した結果を表 3-5 に示す。なお、回収率は、As 及び As の定量値を合算し、この合算値から算出した。ドライ製品は真度が 97.7%、併行精度が 5.03%、室内精度が 8.44%であった。セミドライ製品は真度が 94.6%、併行精度が 6.11%、室内精度が 6.34%であった。ウェット製品は真度が 97.3%、併行精度が 1.87%、室内精度が 11.0%であった。成型ジャーキーは真度が 100.6%、併行精度が 1.10%、室内精度が 10.0%であった。素材乾燥ジャーキーハードタイプは真度が 103.6%、併行精度が 1.31%、室内精度が 6.22%であった。素材乾燥ジャーキーソフトタイプは真度が 103.2%、併行精度が 4.33%、室内精度が 6.44%であった。ビスケットは真度が 92.3%、併行精度が 5.31%、室内精度が 8.56%であった。粉ミルクは真度が 88.2%、併行精度が 2.51%、室内精度が 7.18%であった。全てのペットフード試料において、金属試験妥当性評価ガイドラインの目標値である真度 80 ~ 110%、併行精度 10% 未満、室内精度 15% 未満を満たす結果が得られた。

これらの結果から、ペットフードの iAs は、陰イオン交換カラムを用いることで、2w/v% TMAH 溶液を用いた加熱抽出で得られた抽出液の pH を約 1 に調整するだけで、組成が単純な移動相を用いた IC で良好な分離ができることが分かった。また、定量値の精確さについても金属試験妥当性評価ガイドラインの目標値を満たしており、測定の安定性も良好な結果が得られたことから、本試験法はペットフードの iAs の定量試験を行うのに十分な性能を有していると考えた。

3.4 まとめ

本章では、ペットフードの iAs の定量試験法として、第 1 章及び第 2 章で検討した IC/ICP-MS によるヒ素化合物の形態別定量試験法が適用できるか否かの検討を行った。

ペットフード検査法では、イオン対逆相クロマトグラフィーによりヒ素化合物を化学種ごとに分離する手法を採用しているが、イオン対試薬として用いるブタンスルホン酸ナトリウムは不揮発性で長時間の連続測定では塩が析出し、また多量のイオンを導入することは、検出器の汚染につながる懸念があった。本研究では、これまでに海藻、コメ及び柑橘類の果実のヒ素化合物について、陰イオン交換カラムと炭酸アンモニウム溶液を組み合わせることで、形態別定量試験が安定して行えることを確認してきた。本章においてもこの手法がペットフードにも適用できることを確認するために、ペットフード検査法において適用範囲とされているドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキーハードタイプ、素材乾燥ジャーキーソフトタイプ、ビスケット及び粉ミルクを試料として用い、金属試験妥当性評価ガイドラインを参考に試験法の妥当性評価を行った。

本章で検討を行った試験方法は、海藻、コメ及び柑橘類の果実とは異なり、アルカリ溶液によりヒ素化合物の抽出を行っており、その後の操作で試験溶液の pH を調整する工程があるが、これまでの検討結果と同様に、真度、併行精度及び室内精度においていずれも目標値を満たす良好な結果が得られた。また、測定の安定性についても良好な結果が得られた。

これらの結果から、本章で検討した試験方法はペットフードの iAs の定量試験を行うのに十分な性能を有していると考えた。さらに、ICP-MS への負荷が少なく、装置の洗浄などの保守に係る煩雑さが軽減されていることから汎用性が高い試験方法といえる。

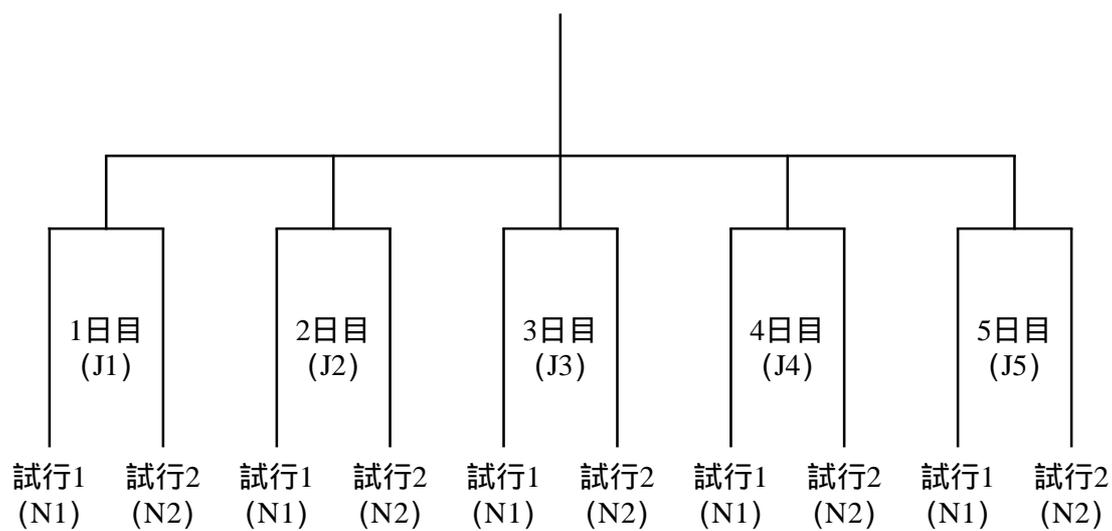


図3-1 iAs定量試験法の妥当性評価の実験計画

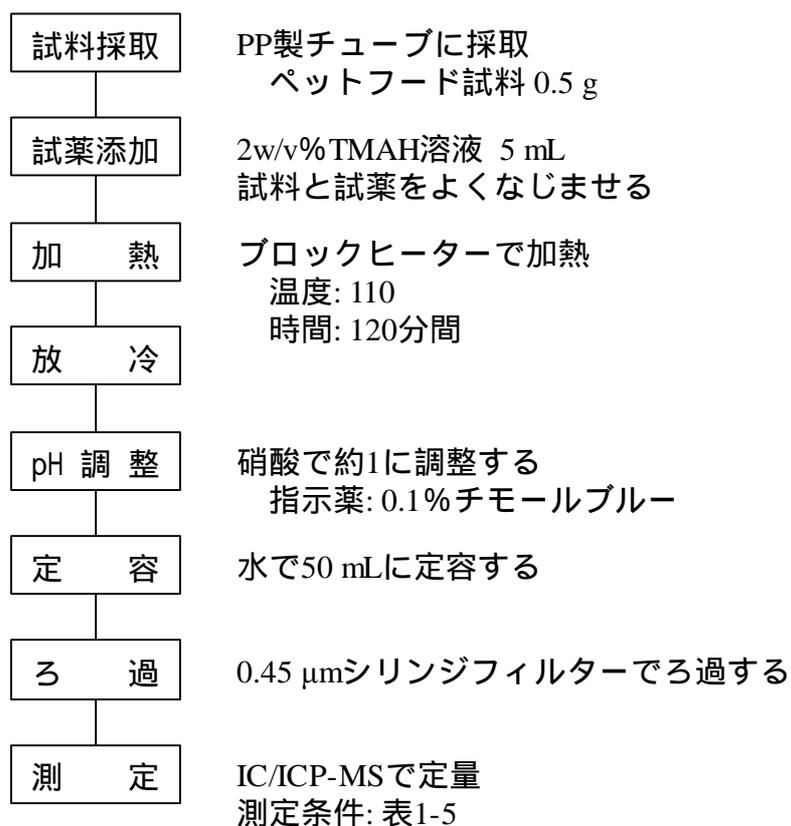


図3-2 ペットフードのiAs抽出方法

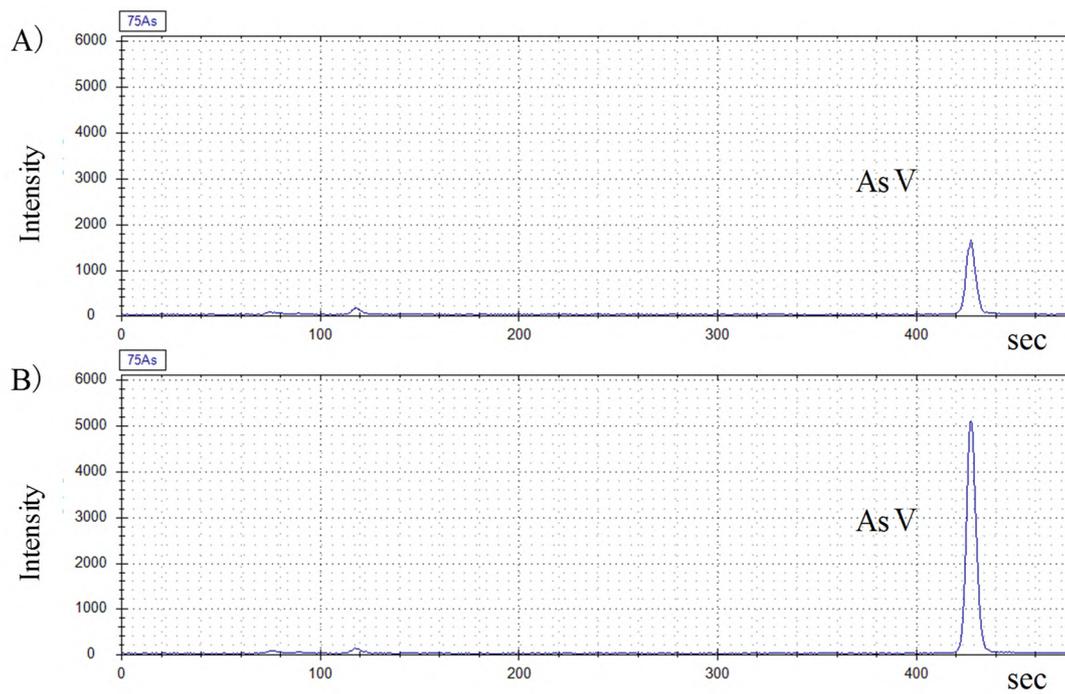


図3-3 試料No.1 ドライ製品のクロマトグラム

A) 試料溶液

B) iAs添加試料溶液

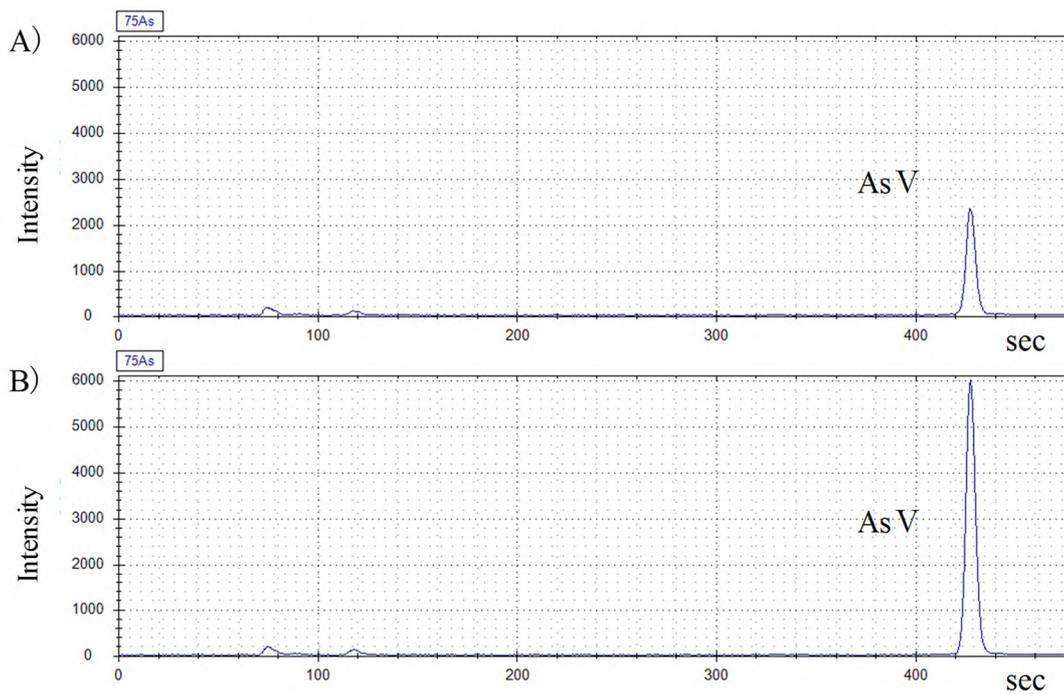


図3-4 試料No.2 セミドライ製品のクロマトグラム

A) 試料溶液

B) iAs添加試料溶液

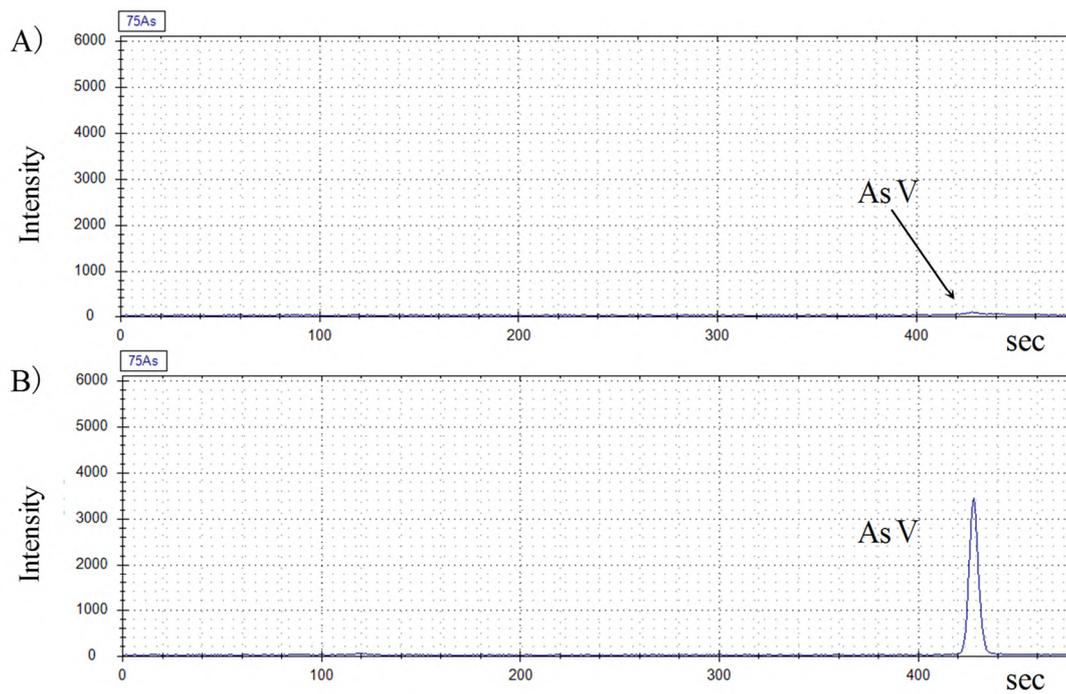


図3-5 試料No.3 ウェット製品のクロマトグラム

A) 試料溶液

B) iAs添加試料溶液

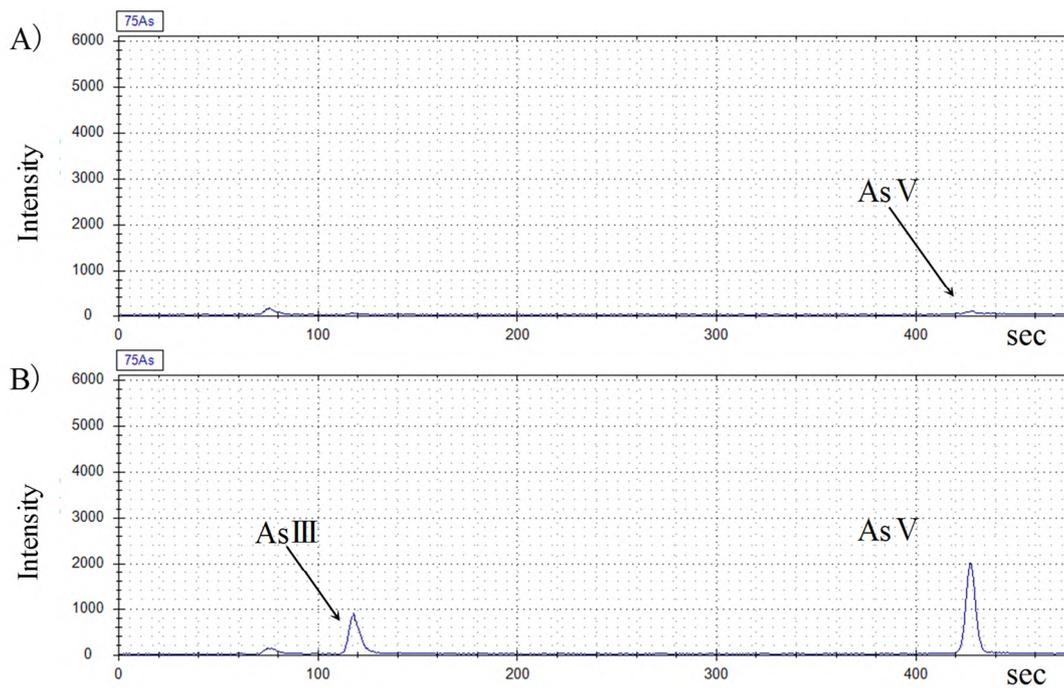


図3-6 試料No.4 成型ジャーキーのクロマトグラム

A) 試料溶液

B) iAs添加試料溶液

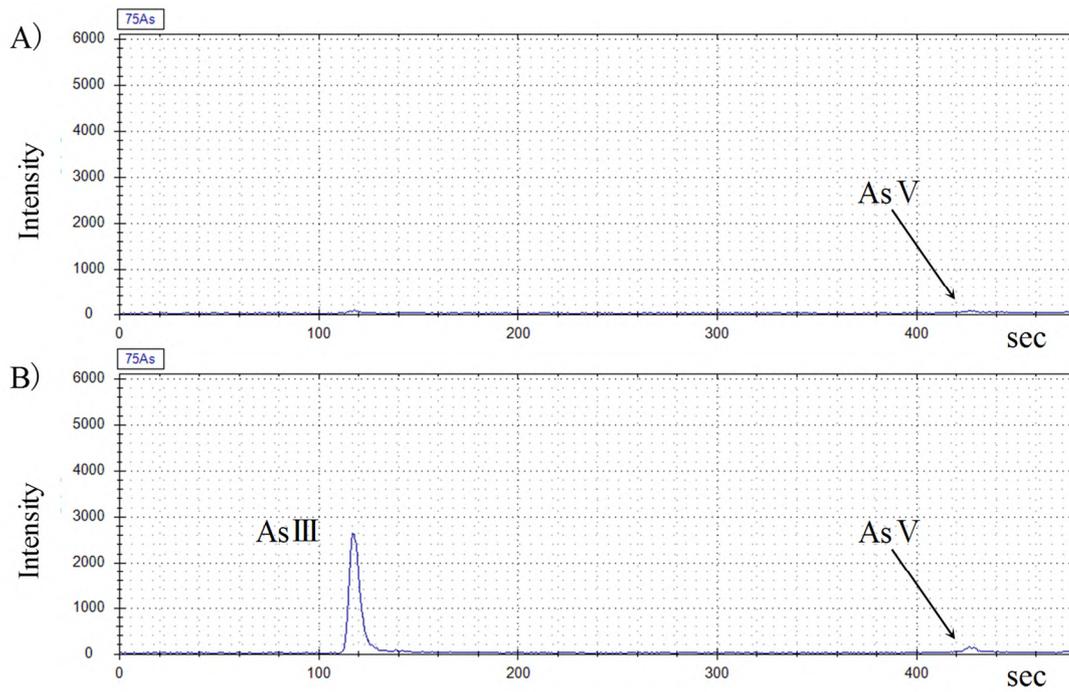


図3-7 試料No.5 素材乾燥ジャーキーハードタイプのクロマトグラム
 A) 試料溶液
 B) iAs添加試料溶液

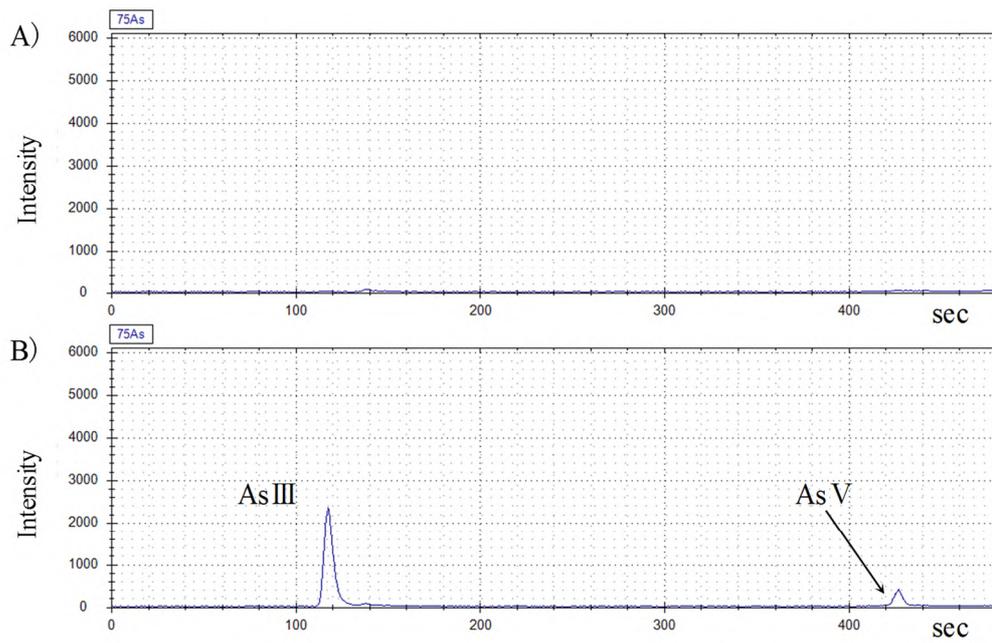


図3-8 試料No.6 素材乾燥ジャーキーソフトタイプ(犬用)のクロマトグラム
 A) 試料溶液
 B) iAs添加試料溶液

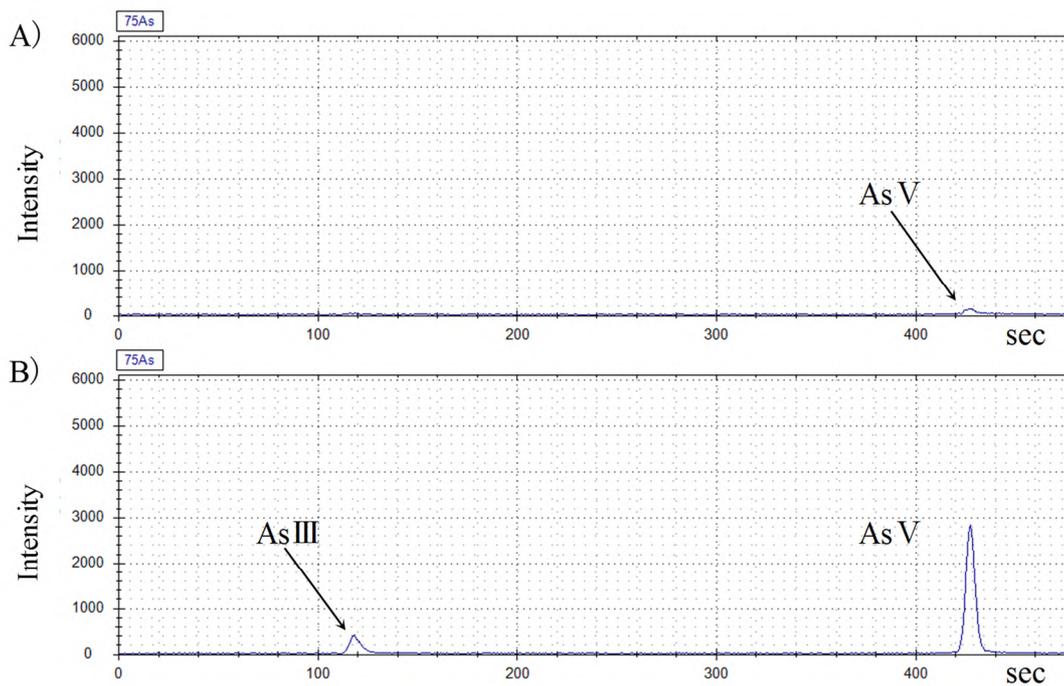


図3-9 試料No.7 ビスケットのクロマトグラム

A) 試料溶液

B) iAs添加試料溶液

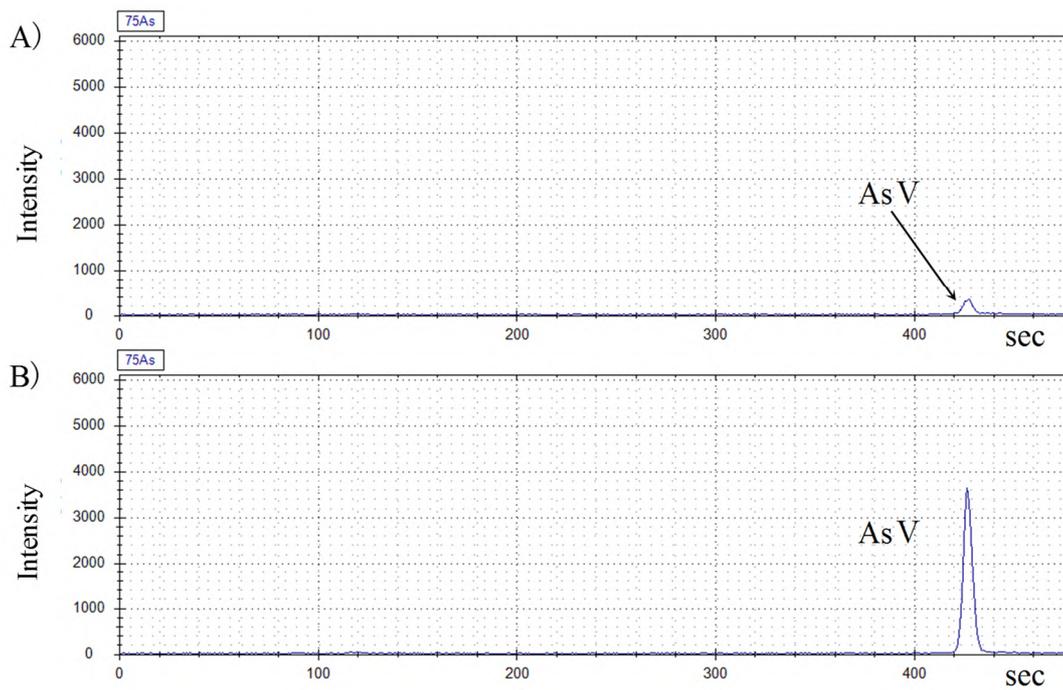


図3-10 試料No.8 粉ミルクのクロマトグラム

A) 試料溶液

B) iAs添加試料溶液

表3-1 愛玩動物用飼料(ペットフード)の成分規格

分類	物質等	定める量
添加物	亜硝酸ナトリウム	100 g/t
	エトキシキン	75 g/t (犬用)
	エトキシキン,BHT及びBHA (総和をいう)	150 g/t
農薬	グリホサート	15 µg/g
	クロルピリホスメチル	10 µg/g
	ピリミホスメチル	2 µg/g
	マラチオン	10 µg/g
	メタミドホス	0.2 µg/g
汚染物質*	アフラトキジンB ₁	0.02 µg/g
	デオキシニバレノール	2 µg/g (犬用) 1 µg/g (猫用)
	カドミウム	1 µg/g
	鉛	3 µg/g
	砒素	15 µg/g
	BHC (α-BHC,β-BHC,γ-BHC及びδ-BHCの総和をいう)	0.01 µg/g
	DDT (DDD及びDDEを含む)	0.1 µg/g
	アルドリン及びディルドリン (総和をいう)	0.01 µg/g
	エンドリン	0.01 µg/g
	ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド (総和をいう)	0.01 µg/g
	その他	メラミン

愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令(平成21年4月28日農林水産省令・環境省令第1号)より

*汚染物質:環境中に存する物質であって、意図せず愛玩動物用飼料中に含まれるものをいう。

表3-2 検討用試料とした犬用ペットフード

試料No.	種類
1	ドライ製品
2	セミドライ製品
3	ウェット製品
4	成型ジャーキー
5	素材乾燥ジャーキーハードタイプ
6	素材乾燥ジャーキーソフトタイプ
7	ビスケット
8	粉ミルク

表3-3 IC/ICP-MSの測定条件

IC条件	
装置	Dionex ICS-5000 ⁺
カラム	Dionex IonPac AS7, (4 mm i.d. × 250 mm)
カラム温度	30
移動相	
溶液	A液: 10 mmol/L 炭酸アンモニウム B液: 200 mmol/L 炭酸アンモニウム
pH	10
流速	1.2 mL/min
勾配	0 min → 2 min, 100% A 2 min → 10 min, 100% B 10 min → 12 min, 100% B 12 min → 12.5 min, 100% A
導入量	25 μL
ICP-MS条件	
装置	iCAP RQ ICP-MS
ネブライザーガス流量	アルゴン 1.054 L/min
補助ガス流量	アルゴン 0.80 L/min
プラズマガス流量	アルゴン 14 L/min
高周波出力	1550 W
コリジョンガス流量	ヘリウム/水素混合ガス 5.075 mL/min
測定質量数	⁷⁵ As

表3-4 測定 of 安定性評価

	化学種	
	As	As
検量線範囲 ngAs/mL	1, 2, 5	
検量線直線性 (r^2)	>0.999	>0.999
安定性 %	>91.3	>90.1
定量下限*1 ngAs/mL	0.05	

*1 試験溶液として

表3-5 枝分かれ実験の結果

	真度% (n=10平均)	併行精度 RSD%	室内精度 RSD%
ドライ製品	97.7	5.03	8.44
セミドライ製品	94.6	6.11	6.34
ウェット製品	97.3	1.87	11.0
成型ジャーキー	100.6	1.10	10.0
素材乾燥ジャーキー			
ハードタイプ	103.6	1.31	6.22
ソフトタイプ	103.2	4.33	6.44
ビスケット	92.3	5.31	8.56
粉ミルク	88.2	2.51	7.18



写真3-1 試料No.1 ドライ製品

原材料： 穀類、肉類、豆類、油脂類、ビール酵母、ハーブ、小魚粉末、チーズパウダー、野菜類、オリゴ糖、カゼインホスホペプチド、クランベリーパウダー、ミネラル類、ビタミン類、着色料、香料、酸化防止剤、グルコサミン、アミノ酸類、バチルフサブチルス、コンドロイチン、調味料



写真3-2 試料No.2 セミドライ製品

原材料： 穀類、肉類、糖類、いも類、野菜類、ミネラル類、品質保持剤、増粘安定剤、保存料、アミノ酸類、ビタミン類、pH調整剤、酸化防止剤、着色料



写真3-3 試料No.3 ウェット製品

原材料：肉類(鶏肉、ささみ)、小麦、ミネラル類、増粘多糖類、ポリリン酸Na



写真3-4 試料No.4 成型ジャーキー

原材料：肉類(鶏、牛)、小麦粉、脱脂大豆、白身魚、小麦たん白、豚血液、エンドウたん白、食塩、ソルビトール、グリセリン、プロピレングリコール、リン酸塩(Na)、保存料、酸化防止剤、pH調整剤、発色剤



写真3-5 試料No.5 素材乾燥ジャーキーハードタイプ
原材料：牛タン、酸化防止剤



写真3-6 試料No.6 素材乾燥ジャーキーソフトタイプ
原材料：七面鳥すじ肉、保湿剤、pH調整剤、発色剤



写真3-7 試料No.7 ビスケット

原材料：小麦粉、砂糖、タピオカでん粉、植物油脂、チーズ、ヨーグルト、ミルクパウダー、チコリ抽出物、ミネラル類、膨張剤、香料、ユッカエキス、着色料



写真3-8 試料No.8 粉ミルク

原材料： 乳類(脱脂粉乳、カゼイン)、油脂類、卵黄粉末、大豆たんぱく、オリゴ糖、L-カルニチン、ミネラル類、乳化剤、ビタミン類、香料、タウリン

結論

1. 結論

本研究では、食品に含まれるヒ素化合物について、IC 及び ICP-MS を用いて簡便で汎用性の高い形態別定量試験法を検討し、その性能を評価することを目的とした。これまでに行われていたヒ素化合物の試験法は、ヒ素化合物を全て iAs に変換し、総ヒ素として測定する方法であった。近年の研究では、HPLC を用いてヒ素化合物を化学種ごとに分離し、ICP-MS により定量する方法が報告されているが、測定条件によっては、ICP-MS への負荷が大きく、測定の再現性については改良が必要と考えられるものもあった。そこで、陰イオン交換クロマトグラフィー及び移動層として炭酸アンモニウム溶液を組み合わせた IC によりヒ素化合物を化学種ごとに分離し、検出器として ICP-MS を用いて測定することで、高感度で再現性の高い測定が実現できると考え検討を行った。

本論第 1 章では、ヒ素化合物含有量が多いことが知られている海藻及びコメを用いて、iAs 及び有機ヒ素化合物の形態別定量試験法の検討を行った。これらの食品は、日本人の食習慣と密接に関わっており、ヒ素化合物の含有量を化学種ごとに把握することは、我々の食生活の安全性の適切な評価につながる。金属試験法妥当性評価ガイドラインの目標値を満たす真度及び精度が得られ、長時間の測定においても装置への負荷が見られなかったことから、本試験法は海藻及びコメのヒ素化合物の形態別定量試験法として十分な性能を有していると判断した。この方法を用いて、代表的な産地で収穫された海藻及び東海三県で収穫されたコメについて、ヒ素化合物の形態別定量試験を実施したところ、海藻は総ヒ素含有量が総じて高く、中でもヒジキは iAs の含有量が特に高かった。一方、コメは海藻に比べて総ヒ素含有量は高くはないが、iAs の占める割合が高いことが分かった。いずれの試料においても、ヒ素化合物の含有量は収穫された地による差はないが、試料の種類によりヒ素化合物の化学種ごとの含有量の高低の傾向は見られた。

第 2 章では、2012 年まで米国において柑橘類の果実に対して農薬として使用が認められていた MMA について、定量試験法の検討を行った。農作物中のヒ素化合物の定量方法は、総ヒ素として測定する方法が採用されているため、検出されたヒ素化合物の由来を特定することが困難な上、操作が煩雑で危険を伴う。そこで第 1 章で検討したヒ素化合物の形態別定量試験法が柑橘類の果実に対して適用できるか検討

した。農薬試験妥当性評価ガイドラインの目標値を満たす真度及び精度が得られたことから、本試験法は柑橘類の果実の MMA 定量試験法として十分な性能を有していると判断した。また、この方法により、農作物中のヒ素化合物の定量試験が安全で容易に実施することが可能となったと考える。

第 3 章では、ペットフードに含まれる iAs の定量試験法について検討した。近年では、ペットも家族の一員と考える飼い主が増え、動物愛護の観点から、与えるペットフードについても高い安全性が要求されるようになってきた。平成 30 年 4 月 23 日に愛玩動物用試料の検査法に収載された iAs の試験法は装置への負荷が懸念されたため、第 1 章で検討した方法が適用できれば、装置への負荷は取り除くことが可能であると考えた。金属試験法妥当性ガイドラインの目標値を満たす真度及び精度が得られたことから、長時間の測定においても装置への負荷が見られなかったことから、本試験法はペットフードの iAs 定量試験法として十分な性能を有していると判断した。

以上の結果、本研究では、陰イオン交換カラムを用いた IC/ICP-MS によるヒ素化合物の形態別定量試験法は、食品及びペットフードのヒ素化合物を化学種ごとに定量し、食品の安全性を適切に評価するための有効な方法の一つであることを証明した。

2. 今後の展望

本研究では、食品及びペットフードに含まれるヒ素化合物の形態別定量試験法について、これまでに報告されている試験法又は公定法と比べて、より簡便で汎用性の高い条件で実施できることを証明した。本試験法は、検討用試料に採用した海藻、コメ、4 種類の柑橘類の果実及び 8 種類の犬用ペットフードに対しては確実に適用できるが、いずれの試料も原材料の加工度合いは比較的 low、試験において前処理が容易な試料が多い。食品及びペットフードは、近年の食生活の変化、ペットとの関わり方により、様々な原材料及び添加物の使用、複雑高度な加工がされるようになった。そのため、全ての食品及びペットフードに対して、本試験法が適用できるかは不明である。我々が日々摂取する食品には、海藻、コメ以外にヒ素化合物を多く含有するものがあり、また、飲用水や自然環境中にもヒ素化合物は存在している。今後は、本試験法が他の食品及びペットフード、更には土壌や環境水な

どの環境試料に対しても適用が可能であるかの検討を続け、我々の食生活の安心、安全に貢献できることを望む。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始熱心なご指導、ご助言を賜りました三重大学大学院工学研究科教授の金子聡先生に深謝の意を表します。

本研究の実施の機会を与えていただき、研究の遂行にご助言いただきました一般財団法人食品分析開発センターSUNATEC 本部長の小林政人様、副本部長の菊川浩史様、検査部門統括の佐藤孝史様に感謝の意を表します。研究データの収集に関し、多大な協力を行ってくださいました第一理化学無機チームリーダーの松岡美帆様に心より感謝致します。また、研究を通して様々な面で協力していただきました第一理化学の職員の皆様に感謝致します。

文献

- [1] 宮下振一, 貝瀬利一, “海産物由来ヒ素化合物の生体影響と体内動態,” 食品衛生学会誌, Vol.51, 71-91(2010).
- [2] 塩見一雄, “海産生物に含まれるヒ素の化学形・毒性・代謝,” 食品衛生学会誌, Vol.33, 1-10(1992).
- [3] Health Effects Division, Office of Pesticide Programs, US Environmental Protection Agency, 2006, “Model of Carcinogenic Action for Cacodylic Acid (Dimethylarsinic Acid, DMAV) and Recommendations for Dose Response Extrapolation.”.
- [4] 食品安全委員会, 平成 25 年 12 月 16 日府食第 1004 号, “化学物質・汚染物質評価書 食品中のヒ素”.
- [5] 農林水産省, 2014, “食品に含まれるヒ素の実態調査,”
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_as/occurrence.html#wheat
[Accessed 25 September 2018].
- [6] 厚生労働省, 2016, “食品中のヒ素に関する基礎情報”.
- [7] 厚生労働省, 2004, “ヒジキ中のヒ素に関する Q&A,”
<https://www.mhlw.go.jp/topics/2004/07/tp0730-1.html#top> [Accessed 25 September 2018] .
- [8] 農林水産省, 2014, “乾燥ヒジキのヒ素を減らす調理法の調査結果,”
http://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/gyokai/g_kenko/busitu/pdf/chousa.pdf
[Accessed 25 September 2018] .
- [9] 農林水産省, 2017, “海外の動向,”
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_as/international.html#1
[Accessed 25 September 2018] .

- [10] Environmental Health Criteria 224, WHO, 2001, “ARSENIC AND ARSENIC COMPOUNDS,” <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm#7.1> [Accessed 25 September 2018] .
- [11] Hamano-Nagaoka, M., Hanaoka, K., Usui, M., Nishimura, T., Maitani, T., “ Nitric Acid-based Partial-digestion Method for Selective Determination of Inorganic Arsenic in Hijiki and Application to Soaked Hijiki,” *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J.Food Hyg. Soc. Jpn.)*, 49, 88-94(2008).
- [12] Hamano-Nagaoka, M., Nishimura, T., Matsuda, R., Maitani, T., “Evaluation of a Nitric Acid-based Partial-digestion Method for Selective Determination of Inorganic Arsenic in Rice,” *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J.Food Hyg. Soc. Jpn.)*, 49, 95-99(2008).
- [13] Narukawa, T., Matsumoto, E., Nishimura, T., Hioki, A., “Determination of Sixteen Elements and Arsenic Species in Brown, Polished and Milled Rice,” *Analytical Sciences*, 30, 245-250(2014).
- [14] Narukawa, T., Suzuki, T., Inagaki, K., Hioki, A., “Extraction techniques for arsenic species in rice flour and their speciation by HPLC-ICP-MS,” *Talanta*, 130, 213-220(2014).
- [15] J.-H. Huang, P. Fecher, G. Ilgen, K.-N. Hu, J. Yang, “Speciation of arsenite and arsenate in rice grain – Verification of nitric acid based extraction method and mass sample survey,” *Food Chemistry* 130 (2012) 453–459.
- [16] Baba, K., Arai, T., Yamaguchi, N., Watanabe, E., Eun, H., Ishizaka, M, “ Chromatographic separation of arsenic species with pentafluorophenyl column and application to rice,” *Journal of Chromatography A*, Vol.1354, 109–116(2014).
- [17] 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知 平成 21 年 9 月 1

日付け 21 消技第 1764 号, “愛玩動物用飼料等の検査法”.

- [18] サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社, “IC-ICP-MS によるりんごジュース中のヒ素のスペシエーション分析,” Application Note EL12005.
- [19] 厚生労働省, 医薬食品局食品安全部長通知 平成 20 年 9 月 26 日食安発第 0926001 号, “食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて”.
- [20] 農林水産省, 2018, “平成 29 年漁業・養殖業生産統計,”
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kaimen_gyosei/ [Accessed 25 September 2018] .
- [21] 農林水産省, 2018, “農林水産物輸出入概況(2017 年),”
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kokusai/houkoku_gaikyou.html#r29
[Accessed 25 September 2018] .
- [22] 日本ひじき協議会, “ひじき Q&A,” <http://www.hijiki.org/html/content14.htm>
[Accessed 25 September 2018] .
- [23] 農林水産省, 2006, “海面漁業生産統計調査 3-2 大海区都道府県支庁別統計 魚種別漁獲量,”
<https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500216&tstat=000001015174&cycle=7&year=20060&month=0&tclass1=000001015175&tclass2=000001022526>.
- [24] 農林水産省, 2017, “平成 29 年産水陸稲の収穫量,”
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/index.html#r
[Accessed 25 September 2018] .
- [25] 独立行政法人農業環境技術研究所, 2016, “HPLC-ICPMS による米(玄米・精米)中ヒ素化合物の形態別分析の標準作業手順書(SOP)Ver.1.1”.

- [26] 農林水産省, 2014, “「平成 24 年度 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,”
<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/140221.html> [Accessed 25 September 2018] .
- [27] 井上嘉則, 川端克彦, 高橋博光, 圓藤吟史, “イオンクロマトグラフィー/誘導結合プラズマ質量分析法を用いた尿中無機及び有機ヒ素化合物の定量,” 分析化学, Vol.44, No.3, 203-208(1995).
- [28] 農林水産省, 2015, “ヒジキに含まれるヒ素の低減に向けた取組,”
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_as/maff_hijiki.html [Accessed 25 September 2018] .
- [29] 農林水産省, 2014, “加工、調理及び保管過程におけるコメ中のヒ素の化学形態別濃度の動態解析,”
http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/regulatory_science/pdf/2401.pdf
[Accessed 25 September 2018] .
- [30] 厚生労働省, 医薬食品局食品安全部長通知 平成 19 年 11 月 15 日食案発第 1115001 号, “食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて”.
- [31] 農林水産省, 環境省, 平成 20 年 6 月 18 日法律第 83 号, “愛がん動物用飼料の安全性の確保に関する法律”.
- [32] 農林水産省, 環境省, 平成 21 年 4 月 28 日農林水産省令・環境省令第 1 号, “愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令”.
- [33] 独立行政法人農林水産消費安全技術センター, “立入検査に係る試験結果の公表,” http://www.famic.go.jp/ffis/pet/sub5_inspection.html[Accessed 10 October 2018] .

[34] 藤井立哉, “ペットフード安全法の 5 年間,” ペット栄養学会誌, Vol.17, 34-43(2014).

[35] サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社, “IC-ICP-MS によるヒ素のスペシエーション分析,” Application Note EL13012.