

2 飼料中のカドミウムの定量法の簡素化

平岡 久明*, 森 有希子*

Simplification of Determination of Cadmium in Feed

Hisaaki HIRAOKA* and Yukiko MORI*

(* Food and Agricultural Materials Inspection Center (I.A.A.), Sendai Regional Center)

An analytical method for determination of cadmium content in feed was simplified. Samples were ashed under 500°C and the ash was boiled with hydrochloric acid. Cadmium content was determined by an atomic absorption spectrophotometer.

A recovery test was conducted with 2 kinds of formula feed, chicken meal, feather meal and fish meal spiked with 0.50 and 1.0 mg/kg of cadmium. The mean recoveries of cadmium were 100.7~111.3%, and relative standard deviations (RSD) were within 8.3%.

A collaborative study was conducted with formula feed spiked with 0.5 mg/kg of cadmium and fish meal in 6 laboratories. The mean recovery of cadmium in formula feed was 107.2%, and repeatability and reproducibility as relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) were 2.7% and 2.0% respectively. For fish meal, the mean value was 0.530 mg/kg, and RSD_r and RSD_R were 2.7% and 4.9% respectively.

Key words: カドミウム cadmium ; 原子吸光光度法 atomic absorption spectrophotometry ; 配合飼料 formula feed ; 共同試験 collaborative study ; D_2 補正 D_2 correction ; 偏光ゼーマン補正 polarization Zeeman correction

1 緒 言

カドミウムは亜鉛鉱石中に存在し、自然界に広く分布している物質である。カドミウムによる中毒には、富山県神通川流域で発生したイタイイタイ病が知られ、骨粗しょう症を伴う骨軟化症と判定されている¹⁾。

カドミウムの分析法は、飼料分析基準²⁾に昭和52年12月28日付け52畜B第3178号により収載された。この分析法は、試料を乾式灰化後、湿式分解を行い、カドミウムをリン酸酸性下でヨウ化物とし、4-メチル-2-ペンタノン (MIBK) で抽出した溶液についてフレイム法の原子吸光光度計を用いて定量する方法である。当該分析法におけるMIBKの使用目的は試料溶液の濃縮効果及び塩類の除去であるが、原子吸光光度計の性能が向上している現在、MIBKによる抽出操作を省略しても十分な感度が得られ、かつ塩類の妨害が補正できると考えられる。

そのため、今回、MIBK抽出を省略し、バックグラウンド補正機能付き原子吸光光度計を用いた飼料中のカドミウムの定量法を検討した。また、原子吸光光度計の2種類の補正方法 (D_2 ランプ及び偏光ゼーマン分裂によるバックグラウンド補正 (以下それぞれ「 D_2 補正」及び「偏光ゼーマン補正」という。)) についても比較検討を実施したので、その概要を報告する。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

2 実験方法

2.1 試料

市販の飼料原料（チキンミール，フェザーミール及び魚粉）及び配合飼料を 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎し，供試試料とした。

2.2 試薬

- 1) カドミウム標準液　カドミウム [Cd] 0.1 g を正確に量ってトールビーカーに入れ，硝酸 (1+9) 50 mL を加え，加熱して溶かし，煮沸して窒素酸化物を除去し，放冷後，水で 1,000 mL の全量フラスコに移し，更に標線まで水を加えてカドミウム標準原液を調製した（この液 1 mL は，カドミウムとして 0.1 mg を含有する．）。

使用に際して，標準原液の一定量を塩酸 (0.1 mol/L) で正確に希釈し，1 mL 中に 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2 及び 0.4 μg を含有する数点のカドミウム標準液を調製した。

- 2) 硝酸，塩酸は有害金属測定用のものを用いた．それ以外の試薬は特級を用いた。

2.3 装置及び器具

- 1) 原子吸光光度計：島津製作所製 AA-6400F 型 (D_2 補正)
- 2) 原子吸光光度計：日立ハイテクノロジーズ製 Z-5010 型 (偏光ゼーマン補正)
- 3) マッフル炉：アドバンテック社製 FUL230FA

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 100 mL のホウケイ酸ガラス製トールビーカーに入れ，穏やかに加熱して炭化させた後，500°C のマッフル炉で加熱して灰化した．残留物に少量の水及び塩酸 10 mL を徐々に加え，更に水を加えて 30 mL とし，数分間煮沸した後放冷した．この液を水で 100 mL の全量フラスコに移し，標線まで水を加えた後，ろ紙（6 種）でろ過し，試料溶液とした．

同時に，試料を用いないで同一操作を行い，空試験溶液を調製した．

2) 原子吸光光度計による測定

試料溶液を原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレーム中で波長 228.8 nm の吸光度を測定した．空試験溶液について，同様に吸光度を測定し，結果を補正した．

同時に，各カドミウム標準液について，試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し，検量線を作成して試料中のカドミウム量を算出した．

3 結果及び考察

3.1 検量線の検討

2.2 で調製したカドミウム標準液について，2 種類 (D_2 補正及び偏光ゼーマン補正) の原子吸光光度計を用いて波長 228.8 nm の吸光度を測定し，検量線を作成した．

その結果，いずれの方式においても検量線は 0.01 から 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で直線性を示した．

3.2 飼料中の無機塩類濃度の把握

カドミウムの測定を行う波長域は無機塩類が大きなバックグラウンド吸収を示すことが知られている³⁾．カドミウムの定量を妨害すると考えられる塩類が飼料中にどれぐらい含まれているか飼料分析基準に従って調べた．配合飼料中に多く添加または含有しているナトリウム，カルシウム，カリウム及びマグネシウムの 4 種類を選び，現在市販されている動物質性飼料，穀類，乾牧

草及び 16 種類の配合飼料を用いて、各含有量を測定した。その結果は Table 1 のとおりで、穀類では塩濃度が低かったが、魚粉及びチキンミールでは 5%以上含まれるものもあった。配合飼料について、ナトリウム、カルシウム、カリウム及びマグネシウムを合計した塩濃度の範囲は 1.04~2.79%であった。

Table 1 Concentration of mineral salts in samples

Kind of feed	(%)			
	Na	Ca	K	Mg
Animal by products				
Fish meal	1.23	5.61	0.59	0.20
	1.04	4.47	0.76	0.14
Chicken meal	0.58	5.52	0.67	0.14
	0.44	6.16	0.67	0.12
Feather meal	0.29	0.52	0.19	0.04
Grains				
Wheat	0	0	0.02	0.09
Rye	0.01	0	0.02	0.06
Milo	0	0	0.02	0.08
Corn	0	0	0.32	0.07
Feed crop				
Alfalfa	0.11	1.54	2.71	0.41
Timothy	0.05	0.56	1.42	0.17
Formula feed	0.08~0.30	0.23~1.11	0.63~1.07	0.10~0.31
(n=16)	(0.19) ^{a)}	(0.67)	(0.84)	(0.17)

a) Mean value (n=16)

3.3 陽イオンがカドミウムの測定に及ぼす影響

各試料が含有する無機塩類についてカドミウムの測定に影響するか検討を行った。ナトリウム、カルシウム、カリウム及びマグネシウムの塩化物を用いて、各陽イオン濃度が 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 及び 0.5%となるように塩酸 (0.1 mol/L) 溶液を調製し、2.4 の定量方法の条件で原子吸光光度計に供した。その結果は Table 2 のとおりで、各陽イオンのうちカドミウム量として定量されたのはカルシウムのみであった。従って、カドミウムの測定に干渉を及ぼす塩類はカルシウム塩であると考えられた。

Table 2 Pseudo concentration of cadmium at various concentrations of various mineral salts (Polarized Zeeman correction)

Concentration (%)	(μg/mL as Cd)				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Na	0	0	0	0	0
Ca	0.0005	0.0025	0.0046	0.0070	0.0090
K	0	0	0	0	0
Mg	0	0	0	0	0

次に、カドミウムの濃度別にカルシウム干渉の影響について調べた。0.01 から 1 μg/mL の濃度の各カドミウム標準液に 0.5%相当量のカルシウムを添加して、D₂補正及び偏光ゼーマン補正の2機種のアトミ吸光光度計に供した。その結果は Table 3 のとおりであった。

Table 3 Effect of calcium on determination of cadmium

		[Absorbance, (μg/mL as Cd)]					
		D ₂ correction			Polarized Zeeman correction		
		Concentration of calcium ion (%)			Concentration of calcium ion (%)		
		Not added	0.5		Not added	0.5	
Concentration of cadmium (μg/mL)	0	0.0000	0.0046	(0.02)	0.0000	0.0019	(0.00)
	0.01	0.0025	0.0076	(0.03)	0.0021	0.0039	(0.02)
	0.04	0.0080	0.0112	(0.05)	0.0078	0.0101	(0.05)
	0.1	0.0226	0.0224	(0.11)	0.0199	0.0224	(0.11)
	0.4	0.0745	0.0757	(0.41)	0.0803	0.0809	(0.42)
	1	0.1821	0.1776	(0.97)	0.1886	0.1864	(0.97)

いずれの補正方法ともカドミウムの低濃度域 (0.1 μg/mL 未満) では、カルシウム無添加の溶液と比べてカルシウムを添加した溶液の方が吸光値は高めに測定され、D₂補正の方がその影響は大きかった。カドミウムの高濃度域 (0.1 μg/mL 以上) では、添加、無添加溶液ともに吸光値は変わりなかった。以上より、カドミウムの低濃度域 (0.1 μg/mL 未満) ではカルシウムの干渉を受けるが、高濃度域 (0.1 μg/mL 以上) ではほとんど影響を受けないことがわかった。

次に、カルシウム干渉を受けたカドミウムの低濃度域において、上記の検討に使用した溶液を MIBK 抽出し、その溶液を D₂補正及び偏光ゼーマン補正の2機種のアトミ吸光光度計を用いて測定した。その結果は Table 4 のとおりで、両補正とも同程度にカルシウム無添加の溶液と比べてカルシウムを添加した溶液の方がカドミウム濃度として高めに定量された。よって、カルシウムの影響は若干ではあるが MIBK 抽出液にも移行していることが考えられた。

Table 4 Effect of calcium on determination of cadmium by MIBK extraction

		[Absorbance, (μg/mL as Cd)]					
		D ₂ correction			Polarized Zeeman correction		
		Concentration of calcium ion (%)			Concentration of calcium ion (%)		
		Not added	0.5		Not added	0.5	
Concentration of cadmium (μg/mL)	0	0.0018	0.0247	(0.02)	0.0092	0.0258	(0.02)
	0.01	0.0101	0.0360	(0.03)	0.0204	0.0372	(0.03)
	0.02	0.0295	0.0471	(0.04)	0.0314	0.0487	(0.04)
	0.04	0.0513	0.0684	(0.06)	0.0470	0.0700	(0.06)
	0.06	0.0698	0.0913	(0.08)	0.0726	0.0926	(0.08)
	0.08	0.0951	0.1093	(0.09)	0.0972	0.1127	(0.10)
	0.1	0.1129	0.1267	(0.11)	0.1171	0.1328	(0.11)

3.4 添加回収試験

本法による回収率及び分析精度の確認のため、添加回収試験 ($n=3$) を行った。

添加回収試験は、牛用配合飼料、鶏用配合飼料、チキンミール、フェザーミール及び魚粉にそれぞれ 0.50 mg/kg 及び 1.0 mg/kg 相当量の cadmium を添加し、2.4 に従って操作を行った。その結果は Table 5 及び Table 6 のとおり、D₂ 補正では平均回収率は 101.3~111.3%、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 8.3%以下であり、偏光ゼーマン補正では平均回収率は 100.7~104.0%、その繰返し精度は RSD として 5.8%以下であった。

また、本操作で得られた試料溶液を用いて MIBK 法も行った。その結果は Table 7 及び Table 8 のとおり、D₂ 補正では平均回収率は 121.0~131.3%、その繰返し精度は RSD として 9.4%以下であり、偏光ゼーマン補正では平均回収率は 108.7~119.3%、その繰返し精度は RSD として 17%以下であった。以上より、D₂ 補正及び偏光ゼーマン補正の両方法とも、本法は MIBK 抽出による飼料分析基準と同等の結果が得られた。

Table 5 Recoveries of cadmium from 5 kinds of feed (D₂ correction)

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for cattle	Formula feed for broiler chicken	Chicken meal	Feather meal	Fish meal
0.50	106.7 ^{a)} (1.1) ^{b)}	110.0 (8.3)	108.7 (4.6)	111.3 (5.5)	108.0 (4.9)
1.0	105.7 (5.8)	107.7 (6.2)	107.7 (6.0)	106.7 (6.9)	101.3 (4.0)

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 6 Recoveries of cadmium from 5 kinds of feed (Zeeman correction)

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for cattle	Formula feed for broiler chicken	Chicken meal	Feather meal	Fish meal
0.50	101.3 ^{a)} (3.0) ^{b)}	101.3 (2.3)	101.3 (1.1)	103.3 (1.1)	104.0 (5.8)
1.0	102.0 (1.0)	101.7 (1.5)	101.0 (3.0)	102.7 (1.1)	100.7 (2.1)

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 7 Recoveries of cadmium from 5 kinds of feed by MIBK extraction (D₂ correction)

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for cattle	Formula feed for broiler chicken	Chicken meal	Feather meal	Fish meal
0.50	127.3 ^{a)} (4.8) ^{b)}	129.3 (7.3)	130.0 (9.4)	122.0 (4.3)	131.3 (2.3)
1.0	131.3 (4.5)	129.7 (5.0)	129.3 (2.9)	123.3 (0.90)	121.0 (3.3)

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 8 Recoveries of cadmium from 5 kinds of feed by MIBK extraction (Zeeman correction)

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for cattle	Formula feed for broiler chicken	Chicken meal	Feather meal	Fish meal
0.50	116.7 ^{a)} (12) ^{b)}	118.0 (13)	118.7 (15)	114.7 (14)	118.7 (16)
1.0	119.3 (17)	115.3 (16)	116.0 (15)	114.0 (14)	108.7 (17)

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

なお、カルシウム濃度が5%程度のチキンミール及びカルシウム濃度が1%程度の配合飼料の定量値を比較したところ、本法及びMIBK法のいずれにおいてもカルシウム濃度の違いによるカドミウムの定量値に対する影響は見られなかった。よって、試料中ではカドミウムの低濃度域でもカルシウムの影響は認められなかった。

魚粉は、いずれの無添加区においても0.49~0.58 mg/kgの定量値が得られ、これはカドミウムの自然汚染による値と考えられた。

魚粉以外の試料では、D₂補正及び偏光ゼーマン補正ともMIBK法の無添加区の定量値が0から0.02 mg/kgであるのに対して、本法では0.01から0.07 mg/kgと高い値が得られた。これはMIBK溶液が本法の試料溶液と比べてバックグラウンドが高く (Table 3 及び 4) , 小さな値を検知しなかったことが考えられた。

3.5 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、カドミウムの標準液と試薬ブランク (10点繰返し) を原子吸光光度計に供して吸光度の比からSN比を算出した。その結果、0.01 µg/mLの標準液のSN比はD₂補正で19, 偏光ゼーマン補正で15であり、両補正ともに10を超えていた。0.01

$\mu\text{g/mL}$ の標準液は本法では 0.1 mg/kg に相当するため、本法の定量下限は 0.1 mg/kg 程度と考えられた。また、検出下限は SN 比が 3 程度となる濃度として 0.03 mg/kg 程度と考えられた。

参考のため、鶏用配合飼料及び魚粉にカドミウムの濃度がそれぞれ 0.05 mg/kg 及び 0.1 mg/kg となるように添加し、2.4 に従って 3 回併行分析を行った。その結果、カドミウム濃度が 0.1 mg/kg の場合、平均回収率は $98.0\sim 112.0\%$ 、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 16% 以下であった。濃度が 0.05 mg/kg の場合、平均回収率は $96.7\sim 123.3\%$ 、その繰返し精度は RSD として 26% 以下であった。

飼料中のカドミウムの指導基準⁴⁾は、配合飼料、乾牧草等で 1.0 mg/kg 、魚粉等で 2.5 mg/kg であり、本法の定量下限は基準値の $1/10$ 以下であった。

3.6 共同試験

本法の再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。

乳牛用配合飼料にカドミウムとして 0.50 mg/kg 相当量を添加した試料及び自然汚染された魚粉を用いて、独立行政法人肥飼料検査所 (現 (独) 農林水産消費安全技術センター) 本部、同札幌事務所 (現 同札幌センター)、同仙台事務所 (現 同仙台センター)、同名古屋事務所 (現 同名古屋センター)、同大阪事務所 (現 同神戸センター大阪事務所) 及び同福岡事務所 (現 同福岡センター) (6 試験室) において、本法に従って共同試験を実施した。

その結果、Table 9 のとおり、魚粉の平均定量値は 0.486 mg/kg 、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_I 及び RSD_R) としてそれぞれ 2.7% 及び 4.9% であり、HorRat は 0.35 であった。また、乳牛用配合飼料の添加試料の平均回収率は 107.2% 、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_I 及び RSD_R) としてそれぞれ 2.7% 及び 2.0% であり、HorRat は 0.12 であった。

一方、現行の飼料分析基準である MIBK 法を用いて行った共同試験の結果を Table 10 に示した。魚粉の平均定量値は 0.530 mg/kg 、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_I 及び RSD_R) としてそれぞれ 4.8% 及び 13% であり、HorRat は 0.46 であった。また、乳牛用配合飼料の添加試料の平均回収率は 116.6% 、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_I 及び RSD_R) としてそれぞれ 1.4% 及び 6.5% であり、HorRat は 0.37 であった。いずれの場合も HorRat が 0.5 を下回っていたが、この原因として、各試験室が本分析法に熟練していたことが考えられた。

なお、参考のため、各試験室で使用した原子吸光光度計の機種及び補正方法を Table 11 に示した。

Table 9 Collaborative study results

Laboratory	(mg/kg)			
	Fish meal		Formula feed for dairy cattle	
1	0.529	0.509	0.511	0.554
2	0.493	0.505	0.529	0.553
3	0.510	0.480	0.530	0.540
4	0.442	0.465	0.530	0.535
5	0.450	0.444	0.535	0.537
6	0.503	0.506	0.540	0.541
Mean value	0.486		0.536	
Recovery (%)	---		107.2	
RSD _r (%) ^{a)}	2.7		2.7	
RSD _R (%) ^{b)}	4.9		2.0	
HorRat	0.35		0.12	

a) Relative standard deviation of repeatability

b) Relative standard deviation of reproducibility

Table 10 Collaborative study results (MIBK extraction method)

Laboratory	(mg/kg)			
	Fish meal		Formula feed for dairy cattle	
1	0.523	0.522	0.579	0.603
2	0.476	0.498	0.557	0.559
3	0.630	0.560	0.530	0.540
4	0.487	0.511	0.578	0.578
5	0.541	0.502	0.640	0.650
6	0.545	0.560	0.590	0.591
Mean value	0.530		0.583	
Recovery (%)	---		116.6	
RSD _r (%) ^{a)}	4.8		1.4	
RSD _R (%) ^{b)}	13		6.5	
HorRat	0.46		0.37	

a) Relative standard deviation of repeatability

b) Relative standard deviation of reproducibility

Table 11 Instruments used by collaborators

Laboratory	Atomic absorption spectrophotometer		Background correction
	1	SHIMADZU AA-6800	
2	Thermo SOLAAR969AA		D ₂ correction
3	HITACHI Z-5010		Polarized Zeeman correction
4	HITACHI Z-5310		Polarized Zeeman correction
5	Thermo SOLAAR969AA		D ₂ correction
6	Thermo SOLAAR969AA		D ₂ correction

4 まとめ

飼料中のカドミウムの定量法として、MIBK 抽出操作を省略する簡易法について検討したところ、次の結果を得た。

- 1) D_2 補正及び偏光ゼーマン補正の両方法とも検量線は、カドミウム濃度 0.01 から 0.4 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で直線性を示した。
- 2) カドミウムの低濃度域 (0.1 $\mu\text{g/mL}$ 未満) ではカルシウムの干渉を受けたが、高濃度域 (0.1 $\mu\text{g/mL}$ 以上) では影響が低かった。また、配合飼料等の試料溶液では、カドミウムの低濃度域であっても定量は可能であった。
- 3) 本法による添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 100.7~111.3%、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 8.3%以下であった。
- 4) 本法の定量下限は 0.1 mg/kg、検出下限は 0.03 mg/kg と考えられた。

なお、本法は平成 18 年 3 月 24 日付けで飼料分析基準に収載された⁵⁾。本法は MIBK 抽出法と比較して、試料 6 点、標準液 5 点で分析した場合、時間にして 2, 3 時間、コストにして約 1,000 円の削減が可能となる。

文 献

- 1) 薬事・食品衛生審議会食品分科会毒性部会：“カドミウムの毒性評価に当たっての検討事項について”，平成 15 年 6 月，参考資料 4 4-1 一般的事項 (2003)。
- 2) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 7 年 11 月 15 日，7 畜 B 第 1660 号 (1995)。
- 3) 社団法人 日本環境測定分析協会 編：“分析実務者のための新明解環境分析技術手法”，34 (2001)，しらかば出版。
- 4) 農林水産省畜産局長通知：“飼料の有害物質の指導基準の制定について”，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988)。
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の一部改正について”，平成 18 年 3 月 24 日，17 消安第 12543 号 (2006)。