

## 6 飼料及び愛玩動物用飼料中の砒素, カドミウム, 鉛及び水銀の迅速・多元素同時定量法の開発

野村 昌代\*, 伊藤 紗織\*, 田端 麻里\*

### Development of Rapid Simultaneous Determination Method of Arsenic, Cadmium, Lead and Mercury in Feed and Pet Food by ICP-MS

Masayo NOMURA\*, Saori ITOU\* and Mari TABATA\*

(\* Fertilizer and Feed inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

We have developed a rapid simultaneous quantitative determination method of the concentration of arsenic, cadmium, lead and mercury in feed and pet food using an inductively coupled plasma-mass spectrometer (ICP-MS).

Having added 5 mL of nitric acid, 2 mL of hydrogen peroxide and 0.4 mL of gold solution to samples, they were digested by a microwave digestion system at 1400 W for 40 minutes. Having further added rhodium and rhenium as internal standard to the digested samples, arsenic, cadmium, lead and mercury were respectively quantified by ICP-MS.

Recovery tests were conducted on formula feed (for finishing period broilers, growing pigs and beef cattle), fish meal, chicken meal, rice straw, dry and wet food for dogs. The resulting mean recoveries ranged from 89.0 % to 101 % for arsenic, 90.4 % to 102 % for cadmium, 88.0 % to 95.2 % for lead, and 84.1 % to 97.8 % for mercury. The repeatability in the form of the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub>) was less than 4.8 % for arsenic, less than 2.3 % for cadmium, less than 6.7 % for lead, and less than 2.3 % for mercury.

Key words: arsenic; cadmium; lead; mercury; inductively coupled plasma- mass spectrometer (ICP-MS); feed; pet food

キーワード：砒素；カドミウム；鉛；水銀；誘導結合プラズマ質量分析計；飼料；愛玩動物用飼料

## 1 緒 言

飼料及び愛玩動物用飼料中の有害重金属等（カドミウム, 水銀, 鉛及び砒素）については, 飼料の有害物質の指導基準及び管理基準<sup>1)</sup>並びに愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令<sup>2)</sup>において Table 1のとおり基準値が定められている.

飼料分析基準<sup>3)</sup>及び愛玩動物用飼料等の検査法<sup>4)</sup>（以下「PF 検査法」という.）には, 有害重金属等の定量法として, 試料の灰化（水銀及び砒素を除く.）の後, 酸による湿式分解を行い, 水銀については還元気化水銀測定装置により, またカドミウム, 鉛及び砒素については原子吸光光度計により測定する方法が記載されている. これらの分析法は, 前処理に時間を要し, 測定も元素ごとに個別に行う必要があるため迅速性に欠ける. 近年, 食品検査等の分野では, マイクロ波分解装置を用いた前処理時間の短縮化, 誘導結合プラズマ質量分析計（以下「ICP-MS」という.）による多元素同時分析が実用化されている.

\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

そこで昨年度は、肥料等試験法<sup>5)</sup>（以下「肥料試験法」という。）及び AOAC Official Method 2015.01<sup>6)</sup>（以下「AOAC法」という。）を基に有害重金属等の ICP-MS による定量法を検討し、魚粉、チキンミール及び稲わらについて真度及び併行精度を確認した。

今年度は、昨年度の検討における鉛の定量下限の推定値（0.8 mg/kg 程度）が、飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた定量下限の目標値（0.4 mg/kg）を満たしていなかったことから、鉛の低濃度範囲での検量線の改善のための検討を行い、また、飼料の一部（配合飼料等）及び愛玩動物用飼料の一部（ドライ製品等）に対する妥当性確認を実施したので、その概要を報告する。

Table 1 Maximum levels of arsenic, cadmium, lead and mercury

Feed types	Maximum levels (feed: mg/kg, pet food: µg/g)			
	Arsenic	Cadmium	Lead	Mercury
Formula feed	2	0.8	2	0.2
Grass hay (except for rice straw)	2	1	3	0.4
Rice straw	7	1	3	0.4
Fish meal	15	3	7	1
Meat and bone meal	7	3	7	1
Pet foods	15	1	3	—

—: Maximum level is not set.

## 2 実験方法

### 2.1 試料

#### 1) 飼料及び愛玩動物用飼料

配合飼料（ブロイラー肥育後期用、子豚育成用、肉用牛肥育用及び乳用牛飼育用）、ポークチキンミール、魚粉、チキンミール、稲わら及び愛玩動物用飼料のドライ製品はそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。愛玩動物用飼料のウェット製品はフードプロセッサで粉砕した。

なお、検討に用いた配合飼料を Table 2 に、愛玩動物用飼料を Table 3 に示した。

Table 2 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For finishing period broilers	Grains	65	Corn, brown rice
	Oil seed meal	26	Soybean meal, rapeseed meal, corn gluten meal
	Brans	1	Rice bran
	Others	8	Vegetable fat, calcium carbonate, salt, calcium phosphate, feed additives
For growing pigs	Grains	71	Corn, polished rice, wheat flour, bread meal, wheat, milo
	Oil seed meal	16	Soybean meal, rapeseed meal, corn germ meal
	Brans	2	Wheat bran
	Animal by-products	2	Fish meal, pork and chicken meal
	Others	9	Food industry by-product, molasses, corn steep liquor, calcium carbonate, calcium phosphate, salt, vegetable fat, betaine, citric acid, animal fat, feed additives
For beef cattle	Grains	76	Heat-treated barley, heat-treated corn, corn
	Brans	16	Wheat bran, corn gluten feed, soybean hulls
	Oil seed meal	7	Soybean meal, rapeseed meal
	Others	1	Calcium carbonate, salt, isomaltoligo saccharide syrup, citric acid, feed additives
For dairy cattle	Grains	61	Heat-treated corn, barley, corn, extruded soybeans
	Oil seed meal	14	Soybean meal
	Brans	8	Wheat bran, corn gluten feed, soybean hull
	Others	17	Cotton seed, alfalfa meal, soybean curd residue, molasses, salt, calcium carbonate, feed additives

Table 3 Ingredients list of pet foods used in this study

Pet food types	Ingredients
Dry food for dogs	Corn, chicken, rice, corn gluten meal, chicken fat, beet pulp, protein hydrolysate, soybean lecithin, fish oil, dried tomato, yeast, whole grain linseed, mannan oligosaccharide, dried chicory, yucca extracts, L-carnitine, vitamins (V. A, V. D <sub>3</sub> , V. E, V. C, V. B <sub>1</sub> , V. B <sub>2</sub> , pantothenic acid, niacin, V. B <sub>6</sub> , folic acid, biotin, V. B <sub>12</sub> , choline), minerals (P, Na, Cl, Ca, K, Fe, Zn, Mn, Se, I), antioxidants (V. E)
Dry food for cats	Grains (corn, white medium soft sugar, corn gluten meal, wheat flour, hominy feed), meats (meat meal, chicken meal), fishes (fish meal, fish powder, dried tuna, whitebait, imitation crab meat chips, shrimp), animal fat, soybean meal, seaweed, oligosaccharide, vegetables (cabbage powder, carrot powder, spinach powder, pumpkin powder), minerals (Ca, P, K, Na, Cl, Fe, Cu, Mn, Zn, I), vitamins (V. A, V. D, V. E, V. K, V. B <sub>1</sub> , V. B <sub>2</sub> , V. B <sub>6</sub> , pantothenic acid, niacin, folic acid, choline), amino acids (methionine, taurine), food yellow no.5, food red no.3, food yellow no.4, food blue no.1, food red no.102, monascus color, antioxidants (rosemary extracts)
Wet food for dogs 1	Meats (chicken, beef, pork, beef extracts), vegetables (carrot, corn, green pea), starches (corn starch), oils and fats (beef oil), sugars (oligosaccharide), polysaccharide thickener (carrageenan), minerals (Na, Cl, Ca, Cu, K, I, Mg, Zn, Fe, Mn), vitamins (choline, V. E, V. B <sub>1</sub> , V. D, V. B <sub>6</sub> , folic acid), chondroitin sulfate, glucosamine
Wet food for dogs 2	Tuna (white meat, dark meat), polished rice, tuna extracts

## 2) FAPAS 試料

The Food and Environment Research Agency で主催している、Food Analysis Performance Assessment Scheme (以下「FAPAS」という。)の Proficiency test 07353 の分析用試料 T07353 (Metallic contaminants in Animal Feed) を使用した。

## 2.2 試薬

- 1) 塩酸及び硝酸は Ultrapur-100 (関東化学製) を用いた。過酸化水素及び酢酸は Ultrapur (関東化学製) を用いた。L-システイン酸は和光特級 (富士フイルム和光純薬製) を用いた。水は Milli-Q Integral 5 (Merck Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。
- 2) 希釈溶媒 (10 µg/mL L-システイン酸含有塩酸-酢酸-硝酸-水 (5+6+10+179) )  
L-システイン酸 1 mg を 100 mL の Digi 製チューブに入れ、水 70 mL を加えて溶かした後、塩酸 2.5 mL, 酢酸 3 mL 及び硝酸 5 mL を加え、更に標線まで水を加えて希釈溶媒を調製した。
- 3) 標準原液  
砒素, カドミウム, 鉛, 水銀, レニウム, ロジウム, 金及びルテチウムの標準原液は、Table 4 に示した供給業者、規格のものをを用いた。

Table 4 Standards used in this study

	Certified value ( $\mu\text{g/mL}$ )	Manufacturers	Specification
Arsenic standard solution	99.4	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Cadmium standard solution	100.2, 99.3	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Lead standard solution	100.1	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Mercury standard solution	100.3	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Rhenium standard solution	1005.1	ACROS ORGANICS	for atomic absorption spectrochemical analysis
Rhodium standard solution	1002	Kanto Chemical	for atomic absorption spectrochemical analysis
Gold standard solution	1004	Kanto Chemical	for atomic absorption spectrochemical analysis
Lutetium standard solution	1004	Kanto Chemical	for atomic absorption spectrochemical analysis

## 4) 重金属等混合標準原液

砒素, カドミウム, 鉛及び水銀標準原液各 750  $\mu\text{L}$  を 15 mL の Digi 製チューブに正確に入れて混合し, 更に標線まで希釈溶媒を加えて重金属等混合標準原液を調製した (この液 1 mL は, 各重金属等としてそれぞれ 5  $\mu\text{g}$  を含有する. ).

## 5) 混合内標準液

レニウム及びロジウム標準原液各 75  $\mu\text{L}$  を 15 mL の Digi 製チューブに入れて混合し, 更に標線まで硝酸 (1+19) を加えて混合内標準原液を調製した (この液 1 mL は, 各内標準としてそれぞれ 5  $\mu\text{g}$  を含有する. ). 更に混合内標準原液 300  $\mu\text{L}$  を 15 mL の Digi 製チューブに入れ, 標線まで硝酸 (1+19) を加えて混合内標準液を調製した (この液 1 mL は, 各内標準としてそれぞれ 100 ng を含有する. ).

## 6) 金-ルテチウム混合液

金及びルテチウム標準原液各 1.5 mL を 15 mL の Digi 製チューブに入れて混合し, 更に標線まで硝酸 (1+19) を加えて金-ルテチウム混合液を調製した (この液 1 mL は, 金及びルテチウムとしてそれぞれ 100  $\mu\text{g}$  を含有する. ).

## 7) 金溶液

金標準原液 1.5 mL を 15 mL の Digi 製チューブに入れ, 標線まで硝酸 (1+19) を加えて金溶液を調製した (この液 1 mL は, 金として 100  $\mu\text{g}$  を含有する. ).

## 8) 重金属等混合標準液

重金属等混合標準原液及び混合内標準液並びに金溶液又は金-ルテチウム混合液の一定量を 15 mL の Digi 製チューブに入れて混合し, 更に標線まで希釈溶媒を加えて正確に希釈し, 1 mL 中に各重金属等として 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8 及び 10 ng, 各内標準として 1 ng, 金として又は金及びルテチウムとして 200 ng を含有する重金属等混合標準液を調製した.

同時に重金属等混合標準原液を加えずに同様に操作し, 各内標準として 1 ng, 金として又は金及びルテチウムとして 200 ng を含有する濃度 0 ng/mL の重金属等混合標準液を調製した.

9) 酢酸無添加希釈溶媒 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  L-システイン酸含有塩酸-硝酸-水 (1+2+37) )

L-システイン酸 1 mg を 100 mL の Digi 製チューブに入れ、水 70 mL を加えて溶かした後、塩酸 2.5 mL 及び硝酸 5 mL を加え、更に標線まで水を加えて酢酸無添加希釈溶媒を調製した。

## 2.3 装置及び器具

## 1) 粉碎機 :

粉碎機 1 (稲わら以外の試料用) :

ZM-200 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 回転数 14000 rpm)

粉碎機 2 (稲わら用) :

SM-100 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1690 rpm)

## 2) 高圧分解容器 : テフロン TFM 容器 100 mL Anton-Paar 製

## 3) マイクロ波分解装置 : Multiwave 3000 Anton-Paar 製

## 4) チューブ

i Sample vials 50 mL ポリプロピレン Thermo Fisher Scientific 製 (以下「Thermo 製チューブ」という.)

ii Centrifuge Tubes with screw caps 50 mL ポリプロピレン Labcon 製 (以下「Labcon 製チューブ」という.)

iii ポリプロピレン製バイアル 50 mL ポリプロピレン ビーエルテック製

iv Digi TUBEs 15 mL, 50 mL 及び 100 mL ポリプロピレン Digi 製 (以下「Digi 製チューブ」という.)

## 5) 全量フラスコ

i Volumetric Flasks 50 mL ポリプロピレン VITLAB 製

ii Volumetric Flasks 50 mL ペルフルオロアルコキシフッ素樹脂 VITLAB 製

iii PP メスフラスコ (プラグ栓付) 50 mL ポリプロピレン アズワン製

iv Volumetric Flask 50 mL ポリプロピレン Thermo Fisher Scientific 製 (以下「Thermo 製全量フラスコ」という.)

## 6) ICP-MS :

オートサンプラー部 : ASX-560 Teledyne Technologies 製

誘導結合プラズマ質量分析計部 : iCAP RQ ICP-MS Thermo Fisher Scientific 製

## 2.4 定量方法

## 1) 抽出

分析試料 0.5 g を正確に量って高圧分解容器に入れ、硝酸 5 mL, 過酸化水素 2 mL 及び金溶液 0.4 mL を加え、発泡がおさまった後マイクロ波分解装置を用いて Table 5 の分解プログラムによって分解した (分解時の温度は約 140~200 °C であった.) . 放冷後、分解液を 15 mL の Digi 製チューブに水で移し込み、更に Digi 製チューブの標線まで水を加え、1,700×g で 5 分間遠心分離した。上澄み液 3.75 mL 及び混合内標準液 0.5 mL を 50 mL の Digi 製チューブに正確に入れ、希釈溶媒を Digi 製チューブの標線まで加え、ICP-MS による測定に供する試料溶液とした。

同時に試料を用いないで同一の操作を行い、空試験溶液を調製した。

Table 5 Operation condition of microwave digestion equipment

Process	Wattage (W)	Tme (min)
Step 1 (Heating)	0→1400	10
Step 2 (Fixed electric power)	1400	40
Step 3 (Cool)	0	30

## 2) ICP-MS による測定

試料溶液, 各重金属等混合標準液及び空試験溶液を ICP-MS に導入し, 各モニターイオンにおけるイオンカウント値を得た. 測定条件を Table 6 に示した.

Table 6 Operation conditions of ICP-MS

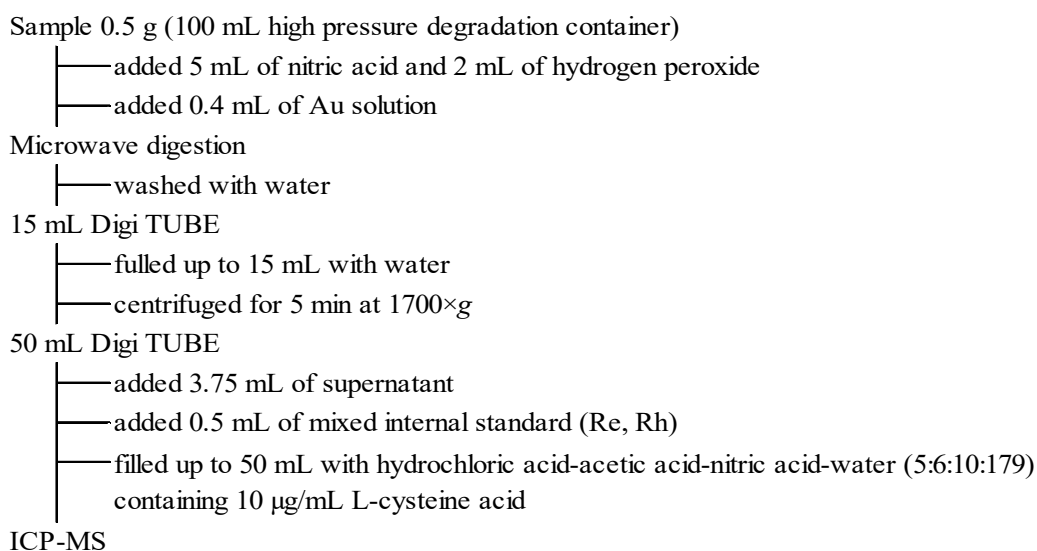
Nebulizer gas	Ar (1.08 L/min)
Plasma gas	Ar (14.0 L/min)
Auxiliary gas	Ar (0.80 L/min)
Collision gas	He (4.34 L/min)
High-frequency output	1550 W
Monitor ion	$^{75}\text{As}$ , $^{114}\text{Cd}$ , $^{208}\text{Pb}$ , $^{202}\text{Hg}$ , $^{103}\text{Rh}$ , $^{187}\text{Re}$

## 3) 計 算

得られたイオンカウント値から砒素及びカドミウムはロジウムで, 鉛及び水銀はレニウムで内標準補正し, 試料中の砒素, カドミウム, 鉛及び水銀量を算出した.

空試験溶液について, 正の値が得られた場合は結果を差し引いた.

なお, 定量法の概要を Scheme 1 に示した.



Scheme 1 Analytical procedure for arsenic, cadmium, lead and mercury in feed and pet food

## 2.5 ルテチウム添加の有無の比較方法

2.2 の 4)の重金属等混合標準原液を希釈溶媒で正確に希釈し添加に用いた.

稲わらについて、砒素として 7 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 17.5 ng/mL），カドミウムとして 1 mg/kg 相当量（同 2.5 ng/mL），鉛として 3 mg/kg 相当量（同 7.5 ng/mL），水銀として 0.4 mg/kg 相当量（同 1.0 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に以下の方法により 2 点併行試験を実施した。

- ①ルテチウム添加：2.4 に従い、金溶液については金-ルテチウム混合液で実施した。
- ②ルテチウム無添加：2.4 に従った。

分析者及び分析日を変更することにより併行精度及び中間精度を算出し、更にそれぞれの定量値について *t*-検定を行った。

## 2.6 容器の比較方法

未使用の 50 mL のチューブ及び全量フラスコを用い、それぞれに酢酸無添加希釈溶媒を 15 mL 程度入れ、1 日経過後に鉛のイオンカウント値を測定した。

## 2.7 容器洗浄効果の確認方法

未使用の 50 mL の Digi 製チューブを用いた。使用前洗浄ありは、JIS K 8007 に準じて硝酸（1+3）又は希釈溶媒を 50 mL 入れ、12 時間以上浸した後、超純水で十分すすぐ操作を行った。それぞれの 50 mL の Digi 製チューブに希釈溶媒を 15 mL 程度入れ、2 時間半経過後又は 1 日経過後に鉛のイオンカウント値を測定した。得られたイオンカウント値についてスミルノフ・グラブズ検定を行い、外れ値の有無を確認した上でイオンカウント値の平均値及び繰り返し精度（RSD<sub>r</sub>）を求めた。

## 2.8 添加回収試験

2.2 の 4)の重金属等混合標準原液を希釈溶媒で正確に希釈し添加に用いた。

配合飼料（ブロイラー肥育後期用、子豚育成用及び肉用牛肥育用）、魚粉、チキンミール、稲わら及び愛玩動物用飼料（ドライ製品（犬用）、ウェット製品（犬用）1 及びウェット製品（犬用）2）について、各重金属等をそれぞれ添加後よく混合し、ウェット製品については 30 分静置した後、それ以外の試料については一夜静置した後に本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰り返し精度を求めた。

なお、同時に重金属等を添加しないで同一の操作を行い、ブランク溶液を調製し、回収率は各試料のブランク値を差し引いて算出した。

# 3 結果及び考察

## 3.1 希釈溶媒の変更

ICP-MS の試料溶液中に炭素が残存した場合、砒素の見かけの感度が増感する。その増感効果を標準液と揃えるために、AOAC 法には酢酸等の炭素源を添加するように記載されている。そこで、標準液及び試料溶液に酢酸を 3 %以上添加することにより、砒素の見かけの感度の増感を補正できるとの報告<sup>7)</sup>を参考に、本法でも酢酸を 3 %添加した希釈溶媒を使用することとした。

## 3.2 ルテチウム添加の有無の比較

AOAC 法では、マイクロ波分解時の試料の損失確認のためにルテチウムを添加している。そこで、ルテチウム添加の必要性を確認するため、重金属等を添加した稲わらについて 2.5 に従い 2 点併行試験により併行精度及び中間精度を算出した。その結果、Table 7 のとおり、いずれの結果も、妥当性確認法ガイドラインに定められた併行精度及び中間精度の目標値を満たす良好な結



果であった。また、*t*-検定の結果、ルテチウムの添加時及び無添加時の分析値に有意な差は認められなかった。そのため、今後の検討では、ルテチウムを添加しないこととした。

Table 7 Comparison with and without lutetium

Heavy metals and others	Spiked level (mg/kg)	Recovery (%)	Repeatability (%)	Intermediate precision (%)	Reference value		
					Repeatability (%)	Intermediate precision (%)	
Without lutetium <sup>a)</sup>	Arsenic	7	98.5	0.7	1.4	12	15
	Cadmium	1	99.1	1.1	2.2	16	20
	Lead	3	94.7	1.9	5.8	14	17
	Mercury	0.4	92.7	1.1	2.7	19	23
With lutetium <sup>a)</sup>	Arsenic	7	97.7	1.1	2.7	12	15
	Cadmium	1	98.3	1.8	1.8	16	20
	Lead	3	93.6	1.1	2.9	14	17
	Mercury	0.4	92.3	0.8	1.7	19	23

a) Degrees of freedom: 4,  $n = 2$

### 3.3 鉛の低濃度範囲の検量線の検討

昨年度の検討において、鉛の検量線の低濃度範囲 (0.05~1 ng/mL) では相関係数が 0.995 を下回るため、鉛の検量線の範囲を 1~10 ng/mL としており、このため鉛の定量下限の推定値は 0.8 mg/kg 程度と見積もられていた。この値は妥当性確認法ガイドラインの目標値 (0.4 mg/kg) を満たさないため、鉛の低濃度範囲の検量線の改善のための検討を行うこととした。

#### 1) 容器の比較

低濃度範囲で相関係数が低くなる原因として、昨年度の検討において鉛のイオンカウント値が濃度 0 ng/mL の標準液で 50000~140000 cps 程度と高かったことから、ガラス製の器具からの鉛の溶出によるバックグラウンド値の上昇によるものと考えられた。そこで、本検討に使用可能な樹脂製のチューブ及び全量フラスコを確認するため、2.6 に従い、鉛のイオンカウント値を比較した。

その結果、Table 8 に示すように、Thermo 製チューブ、Labcon 製チューブ、Digi 製チューブ及び Thermo 製全量フラスコのイオンカウント値が比較的 low だった。これらのうち、定量に用いることができる Digi 製チューブ及び Thermo 製全量フラスコがガラス製全量フラスコの代替として本法に使用可能と考えられたが、Thermo 製全量フラスコは使用後の洗浄が必要であるため、使い捨て可能な Digi 製チューブを使用するのが適当と考えられた。Thermo 製全量フラスコは、50 mL のみの製造であったが、Digi 製チューブは、50 mL の他に 15 mL 及び 100 mL の製造があり、溶媒の液量に応じて使い分けることが可能である。また、2.2 の 8) に従い、Digi 製チューブを用いて調製したところ、ルテチウム無添加の濃度 0 ng/mL 標準液でイオンカウント値を 1200~6800 cps 程度に抑えることができた。以上のことから、今後、本法では Digi 製チューブを用いることとした。

Table 8 Comparison of ion count value of lead (Comparison with vessels)

Vessel	Manufacturers	Quantification availability	Material	Ion count value (cps)
Tube	Thermo Fisher Scientific	×	PP	3381
	Labcon	×	PP	3601
	BL TEC K.K.	○	PP	16353
	Digi	○	PP	5153
Volumetric flask	VITLAB	○	PP	24168
		○	PFA	29083
	AS ONE	○	PP	33952
	Thermo Fisher Scientific	○	PP	4224

$n = 1$

PP: Polypropylene

PFA: Tetrafluoroethylene/perfluoro (alkyl vinyl ether) copolymer

## 2) 容器洗浄効果の確認

Digi 製チューブの使用前洗浄が必要か確認するため、2.7 に従い、鉛のイオンカウント値を比較した。

その結果、Table 9 のとおり、使用前洗浄なしと使用前洗浄を行ったものとの間で、いずれもイオンカウント値に大きな差は見られなかったことから、使用前の洗浄は行わないこととした。

Table 9 Comparison of ion count value of lead (Confirmation of effects of vessel washing)

Assay date	The solvent for vessels washing	Ion count value (cps)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
After 2.5 hours	Without washing	3310 <sup>a)</sup>	7.7
	Nitric acid (1+3)	3268 <sup>a)</sup>	0.8
	Diluent solvent	3185 <sup>a)</sup>	3.7
The following day	Without washing	3104 <sup>a)</sup>	6.7
	Nitric acid (1+3)	3112 <sup>a)</sup>	2.0
	Diluent solvent	2949 <sup>c)</sup>	2.8

a) Mean ( $n = 4$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Mean of data retained after eliminating outliers excluded by Smirnov-Grubbs test ( $n = 3$ )

## 3) 鉛の低濃度範囲の検量線

3.3 の 1)及び 2)の結果を基に、2.2 の 8)により鉛の低濃度範囲 (0.05~1 ng/mL) の検量線を作成した。その結果、相関係数が改善し、直線性を示した。得られた検量線の一例を Fig. 1 に示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、鉛を 0.02~0.4 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の鉛の濃度範囲に相当する。

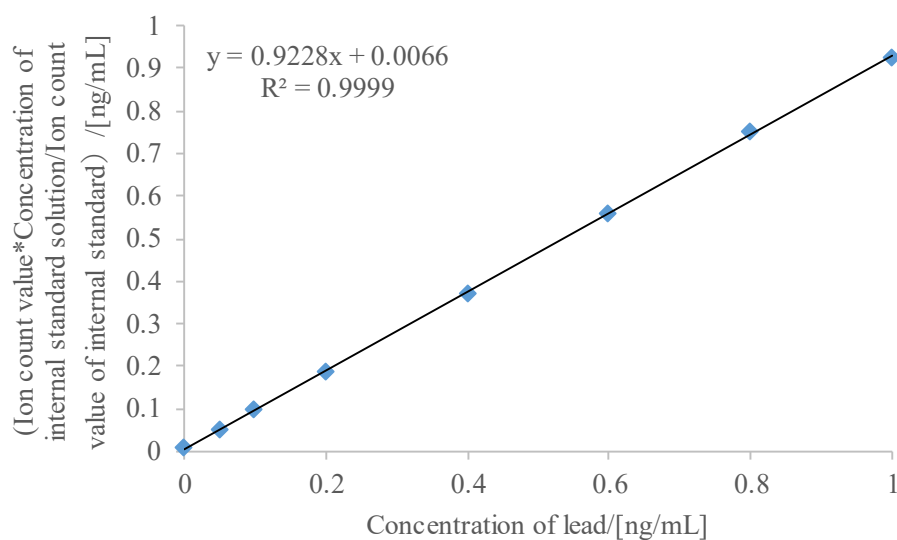


Fig. 1 Calibration curve of lead in low concentration

### 3.4 検量線

3.3の結果を基に、2.2の8)により各重金属等の検量線を作成した。その結果、いずれの重金属等においても0.05~10 ng/mLの範囲で直線性を示した。得られた検量線の一例をFig. 2に示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、各重金属等を0.02~4 mg/kg含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各重金属等濃度範囲に相当する。

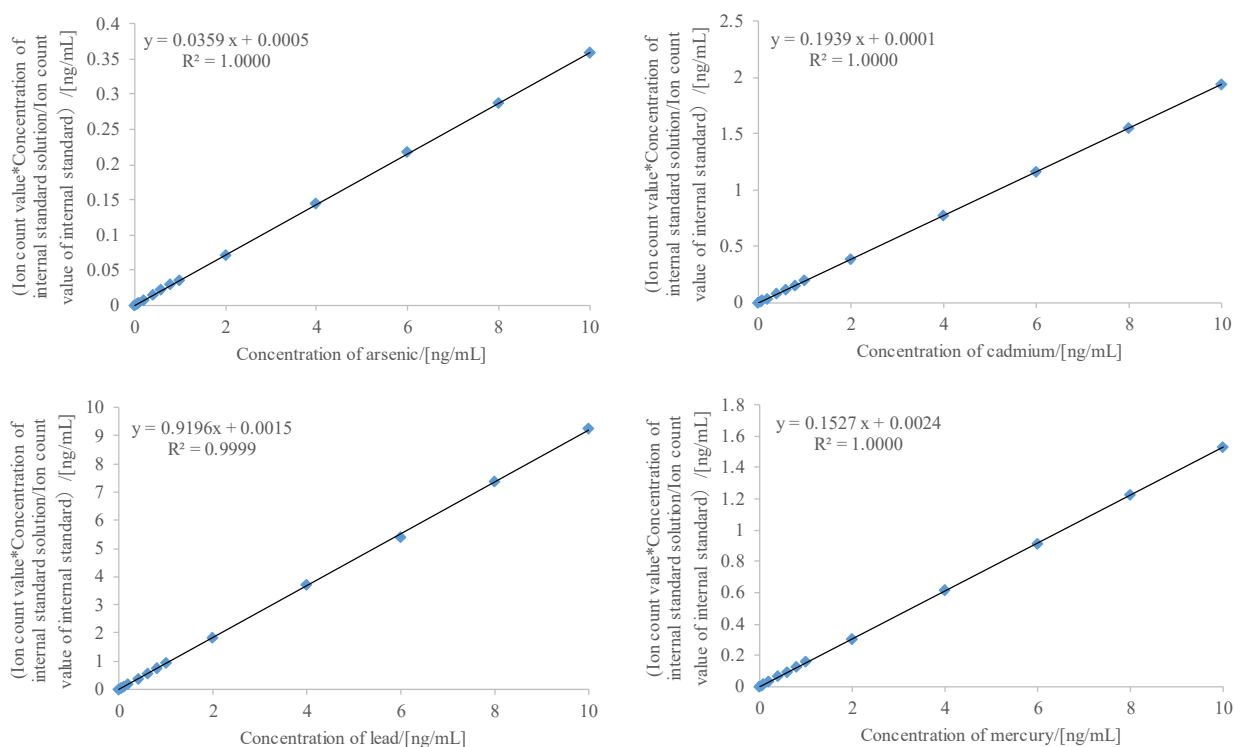


Fig. 2 Calibration curves of arsenic, cadmium, lead and mercury

### 3.5 選択性の確認

配合飼料（ブロイラー肥育後期用，子豚育成用及び乳用牛飼育用），チキンミール，ポークチキンミール，稲わら及び愛玩動物用飼料（ドライ製品（猫用）及びウェット製品（犬用））各 1 検体並びに魚粉 2 検体を用い，本法により試料中の砒素，カドミウム，鉛及び水銀量を算出した．その結果，複数の試料について砒素，カドミウム，鉛及び水銀が検出された．

そこで，砒素，カドミウム，鉛及び水銀が検出された試料について，飼料分析基準又は PF 検査法に従い分析した．その結果は Table 10 のとおりである．砒素，カドミウム及び鉛では，飼料分析基準又は PF 検査法よりも本法の方が高感度であり，水銀はその逆であるため，感度が低い分析法では不検出となる試料が認められた．定量下限未満の値はばらつきがあることを考慮すると，本法で得られた定量値は分析対象の自然汚染のものと考えられ，本法の選択性に問題はないと考えられた．

なお，稲わら中のカドミウムについては，Table 10 のとおり，本法と比較して飼料分析基準の方が，定量値が小さくなる傾向が認められた．稲わらはケイ酸含有量が多く突沸しやすいため，飼料分析基準では通常（200 °C 以上）より低い温度（185 °C）でしか加熱できなかった．そのため，分解不十分となり，定量値に差が生じたと考えられた．

Table 10 Quantitative results of this method and analytical standards method of feeds or inspection method for pet foods

Sample types	Analytical methods	Arsenic	Cadmium	Lead	Mercury
		Quantitative value (mg/kg)	Quantitative value (mg/kg)	Quantitative value (mg/kg)	Quantitative value (mg/kg)
For finishing period broilers	I	0.095	0.025	0.033	ND
	II	(0.079)	(0.029)	(0.029)	(0.004)
For growing pigs in all stage	I	0.069	0.031	0.063	ND
	II	(0.032)	<LOD	(0.078)	(0.017)
For dairy cattle	I	0.023	0.038	0.025	ND
	II	<LOD	(0.046)	<LOD	<LOD
Rice straw	I	0.269	0.211	0.271	0.005
	II	0.250	0.175	(0.330) <sup>a)</sup>	(0.004)
Fish meal 1	I	5.66	1.01	0.329	0.370
	II	5.79	1.07	(0.370)	0.398
Fish meal 2	I	4.24	0.772	0.208	0.255
	II	4.28	0.772	(0.220)	0.271
Chicken meal	I	0.080	0.076	0.106	0.008
	II	(0.111) <sup>a)</sup>	(0.064) <sup>a)</sup>	(0.131) <sup>a)</sup>	(0.003)
Pork and chicken meal	I	0.060	0.030	0.179	0.003
	II	<LOD	<LOD	<LOD	(0.023)
Dry food for cats	I	0.628	0.112	0.070	0.039
	III	0.629	0.107 <sup>b)</sup>	<LOD	0.036
Wet food for dogs 2	I	1.14	0.013	ND	0.034
	III	1.28 <sup>a)</sup>	(0.015)	<LOD	0.037
Analytical standards	Limit of quantification (mg/kg)	0.2	0.10	0.5	0.03
Method of feeds and inspection method for pet foods	Limit of detection (mg/kg)	0.05	0.03	0.2	0.01 <sup>c)</sup>
					0.02 <sup>d)</sup>

I: This method

II: Analytical standards method of feeds

III: Inspection method for pet foods

Except where noted:  $n = 1$

ND: Not detected

( ): Less than the limit of quantification

<LOD: Less than the limit of detection

a) Mean ( $n = 3$ )

b) Mean ( $n = 2$ )

c) Limit of detection by Analytical standards method of feeds

d) Limit of detection by Inspection method for pet foods

### 3.6 FAPAS 試料の分析

本法の妥当性を確認するため、FAPAS 試料を用いて 2.4 に従って定量を行った。

その結果、Table 11 に示すように、いずれの結果も  $z$ -スコア 2 以下の結果であった。

Table 11 Quantitative results of FAPAS sample

	Arsenic	Cadmium	Lead	Mercury
FAPAS assigned value (mg/kg)	321	204	2176	35.7 <sup>a)</sup>
Quantitative value (mg/kg)	297	203	2111	23.6 <sup>a)</sup>
$z$ -Score	-0.39	-0.02	-0.21	-1.54

a) Less than the limit of quantification

### 3.7 添加回収試験

2.8 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 12 のとおり、砒素については平均回収率 89.0~101 %，その繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 4.8 %以下，カドミウムについては平均回収率 90.4~102 %， $RSD_r$  は 2.3 %以下，鉛については平均回収率 88.0~95.2 %， $RSD_r$  は 6.7 %以下，水銀については平均回収率 84.1~97.8 %， $RSD_r$  は 2.3 %以下の成績が得られ，妥当性確認法ガイドライン及び PF 検査法第 11 章試験法の妥当性確認法（以下「PF 検査法の妥当性確認法」という。）に定められた 1) 及び 2) の真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果であった。

#### 1) 真度：

70 %以上 120 %以下（飼料）

60 %以上 115 %以下（愛玩動物用飼料における添加濃度 0.04 mg/kg）

80 %以上 110 %以下（同 0.6 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 7 mg/kg 及び 15 mg/kg）

#### 2) 精度：

22 %以下（添加濃度 0.04 mg/kg）

17 %以下（同 0.6 mg/kg）

14 %以下（同 2 mg/kg 及び 3 mg/kg）

12 %以下（同 7 mg/kg）

11 %以下（同 15 mg/kg）

Table 12 Recoveries for arsenic, cadmium, lead and mercury

Sample types	Arsenic				Cadmium			
	Natural contamination	Spiked level	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup>	Natural contamination	Spiked level	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup>
	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)
For finishing period broilers	0.095	2	97.6	1.1	0.021	0.04	97.7	0.9
					0.025	0.8	102	1.0
For growing pigs in all stage	0.069	2	96.7	1.4	0.030	0.04	93.2	1.1
					0.031	0.8	101	1.1
For dairy cattle	0.018	0.04	92.4	4.8	0.021	0.04	102	2.2
	0.015	2	94.2	0.5	0.027	0.8	98.4	0.9
Rice straw	0.269	7	101	0.8	0.211	1	101	1.5
Fish meal 2	4.24	15	97.2	1.7	0.772	3	99.3	1.4
Chicken meal	0.080	7	96.8	0.9	0.076	3	98.2	0.5
Dry food for dogs	0.240	15	99.1	0.7	0.055	1	101	0.9
Wet food for dogs 1	0.003	0.04	96.6	2.3	0.003	0.04	95.2	1.9
	0.003	3	89.0	1.3	0.003	0.2	94.5	1.4
Wet food for dogs 2	—	—	—	—	0.015	0.04	90.4	2.3

Sample types	Lead				Mercury			
	Natural contamination	Spiked level	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup>	Natural contamination	Spiked level	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup>
	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)
For finishing period broilers	0.033	2	92.7	0.4	ND	0.04	86.3	1.5
					ND	0.2	86.4	1.0
For growing pigs in all stage	0.063	2	92.6	0.8	ND	0.04	90.1	0.8
					ND	0.2	90.6	1.5
For dairy cattle	0.008	0.04	91.2	6.7	ND	0.04	84.1	1.0
	0.010	2	91.8	0.9	ND	0.2	84.4	0.9
Rice straw	0.271	3	95.2	0.6	0.003	0.04	91.7	2.3
					0.005	0.4	94.6	0.7
Fish meal 2	0.208	7	90.8	1.1	0.255	1	90.6	0.8
Chicken meal	0.106	7	88.0	0.6	0.008	0.04	92.3	2.2
					0.008	1	89.3	1.0
Dry food for dogs	0.144	3	93.1	1.0	0.007	0.04	91.3	2.0
					0.006	1	95.5	0.5
Wet food for dogs 1	0.232	0.6	91.8	2.6	ND	0.04	93.2	1.3
					ND	0.2	92.9	0.7
Wet food for dogs 2	ND	0.04	90.2	1.0	0.033	0.04	97.8	1.3

—: Not tested

ND: Not detected

a)  $100 \times (\text{mean of quantitative values of the five samples} - \text{natural contamination}) / \text{spiked level}$ 

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.8 定量下限及び検出下限

各重金属等の検量線が直線性を示した範囲、各 0.05~10 ng/mL の下端付近となる濃度（0.04 mg/kg 相当量（最終試料液中濃度 0.1 ng/mL 相当量））における添加回収試験を実施したところ、その結果は良好であり、かつ、標準偏差の 10 倍は当該濃度を超えていなかった。従って、各重金属等の定量下限の濃度は 0.04 mg/kg とした。

また、検出下限は、先の標準偏差に自由度 4、片側有意水準 0.05 の Student の  $t$ -値を乗じた値の 2 倍（= 4.26）、すなわち定量下限の 4.26/10 倍、0.02 mg/kg とした。

この定量下限及び検出下限の濃度は飼料中の重金属等の管理基準値に対して 1/5 以下及び 1/10 以下、愛玩動物用飼料の重金属等の管理基準値に対して 1/25 以下及び 1/50 以下であり、妥当性確認法ガイドライン及び PF 検査法の妥当性確認法に定められた 1) 及び 2) の基準値に対する定量下限及び検出下限の目標値を満たしていた。

- 1) 定量下限：1/5（飼料及びウェット製品以外の愛玩動物用飼料）、1/2（ウェット製品（水分含有量 10% に換算したもの））
- 2) 検出下限：1/10（飼料及びウェット製品以外の愛玩動物用飼料）、1/3（ウェット製品（水分含有量 10% に換算したもの））

なお、Table 12 に示したとおり、当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良好であった。

## 4 まとめ

飼料及び愛玩動物用飼料に含まれる有害重金属等（砒素、カドミウム、鉛及び水銀）の定量について、肥料試験法及び AOAC 法を基に昨年度開発した ICP-MS を用いた多元素同時定量法の飼料分析基準及び PF 検査法への適用の可否について検討したところ、希釈溶媒への酢酸の追加、マイクロ波分解時のルテチウム添加の省略及び全量フラスコを Digi 製チューブへ変更することで、以下の結果が得られた。

- 1) 検量線は、それぞれ 0.05~10 ng/mL の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、各重金属等を 0.02~4 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各重金属等濃度範囲に相当する。

- 2) 配合飼料（ブロイラー肥育後期用、子豚育成用及び乳用牛飼育用）、魚粉、チキンミール、ポークチキンミール、稲わら及び愛玩動物用飼料（ドライ製品及びウェット製品）について、本法に従って得られたイオンカウント値から内標準法により試料中の各重金属等の量を算出した結果、複数の試料について各重金属等が検出されたが、本法で得られた定量値は分析対象の自然汚染のものと考えられ、本法の選択性に問題はないと考えられた。
- 3) FAPAS 試料を用いて本法の妥当性を確認したところ、 $z$ -スコア 2 以下の結果が得られた。
- 4) 配合飼料（ブロイラー肥育後期用、子豚育成用、肉用牛肥育用）、魚粉、チキンミール、稲わら及び愛玩動物用飼料（ドライ製品及びウェット製品）について各重金属等を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドライン及び PF 検査法の妥当性確認法に定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。



- 5) 本法の各重金属等の定量下限の濃度は 0.04 mg/kg, 検出下限は 0.02 mg/kg であった. 設定した定量下限及び検出下限は, 妥当性確認法ガイドライン及び PF 検査法の妥当性確認法に定められた目標値を満たしていた.

## 文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準の制定について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 2) 農林水産省令・環境省令：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 (2009).
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 4) 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：「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について，平成 21 年 9 月 1 日，21 消安第 1764 号 (2009).
- 5) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター：肥料等試験法 (2019).
- 6) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th Edition, AOAC official method 2015.01 heavy metals in food. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 7) 藤崎 浩二，藤田 治子，松本 宏志，箸本 弘一，鍵 裕明：ICP-MS による調製粉乳中ミネラルの迅速一斉分析，食品衛生学雑誌，52，336-339 (2011).