

急性食中毒発生時の迅速分析法の検討 (II) —誘導結合プラズマ質量分析法による食品中の有害金属の迅速定量—

藤田 久雄・田中 さと子・毛利 孝明・西岡 千鶴・吉田 明美・
塚本 武・黒田 弘之

The examination of quick analysis method in case of acute food poisoning occurrence (2)
Rapid Determination of Harmful Metals in Foods by Inductively
Coupled Plasma Mass Spectrometry -

Hisao FUJITA, Satoko TANAKA, Takaaki MOURI, Chizuru NISIOKA, Akemi YOSIDA,
Takesi TUKAMOTO, Hiroyuki KURODA

I はじめに

近年、地下鉄サリン事件、和歌山県で発生した毒物混入カレー事件、新潟のアジ化ナトリウム入りお茶事件など化学物質による地域住民の生命、健康、安全に影響を及ぼすおそれのある事態が頻発している。衛生研究所は、このような健康危機事態の発生時に、原因物質を迅速かつ正確に解明できる分析体制を整備するため、平成10年度から「アジ化ナトリウムの迅速分析法の検討」等薬毒物検査マニュアルの作成に関する研究を進めてきた。今回、急性毒性を持つ有害金属の迅速分析方法の検討を行った。有害金属の分析法としては、試料を直接蛍光X線分析する方法、試料を灰化した後、発光分光分析法、ICP発光分光分析法、イオンクロマトグラフィー、原子吸光光度法^{1) 2)}がある³⁾。これらの方法の中で、緊急時の迅速性・信頼性を優先課題として、試料の灰化法は微量迅速分解が可能なマイクロウェーブ分解システムを用い、金属の検出は高感度・多元素同時分析が可能な誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS)⁴⁾を用いて、定性分析及び有害金属20元素 (B, Al, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Sn, Sb, Te, Ba, Tl, Pb, U) の定量分析について検討した結果を報告する。

II 実験方法

1. 項目

- ① 金属元素の定性分析
- ② 有害金属20元素の定量分析
ホウ素(B), アルミニウム(Al), バナジウム(V), クロム(Cr), マンガン(Mn), コバルト(Co), ニッケル(Ni), 銅(Cu), 亜鉛(Zn), ヒ素(As), セレン(Se), モリブデン(Mo), カドミウム(Cd), スズ(Sn), アンチモン(Sb), テルル(Te), バリウム(Ba), タリウム(Tl), 鉛(Pb), ウラン (U)

2. 試料

試料は濃度の明らかな標準試料及び13群のトータルダイエット試料を用いた。

- ① 食品標準試料：①NIST 1568 a Rice Flour (米) ②NIST 1577b Bovine Liver (レバー)
- ② トータルダイエット試料：食品1～13群 (1群：米類 2群：雑穀・芋類 3群：砂糖・菓子 4群：油脂 5群：豆・豆加工品 6群：果実 7群：有色野菜類 8群：野菜・海藻類 9群：嗜好品 10群：魚介類 11群：肉・卵類 12群：乳・乳製品 13群：加工食品)

トータルダイエット試料は、厚生省の平成6年国民栄養調査による食品群別摂取量調査をもとにして、1999年に約140品目を香川県内で購入した。

実際の食事形態に従って、各食品をそのまま又は調理した後、13群に大別し、ホモジナイズし、 -20°C 保存したものである。

3. 試薬

硝酸、過酸化水素は多摩化学工業製の超高純度試薬TAMAPURE-AA-100を、標準液はEM社製25種混合標準液(ICPMS061-1)と単元素の和光純薬製金属標準液($1000\mu\text{g/ml}$)を用いた。水はヤマト科学製WR-600Aで製造した超純水を用いた。

4. 器具

TPX試験管(10, 20ml), PFAテフロン瓶(50, 500ml), TFMテフロン分解瓶を用いた。マイクロピペット、チップ(5000, 1000, 200, $10\mu\text{L}$)はFinnpipette製及びNICHIRYO製を使用した。

5. 器具の洗浄

TPX試験管及びテフロン瓶は 0.5mol/L 硝酸 1ml で3回洗浄し、約 0.05mol/L 硝酸を満たしておき、使用前に超純水で洗浄して用いた。チップは使用前に 0.5mol/L 硝酸で5回洗浄(吸引・排出)して用いた。TFM分解容器は 0.5mol/L 硝酸洗浄後、高純度硝酸 1ml 蒸留水 10ml を加えてマイクロウェーブで加熱、超純水で良く洗浄した後、約 0.05mol/L 硝酸を満たしておき、使用前に超純水で洗浄して用いた。

6. 装置

- ① マイクロウェーブ分解システム:
MILESTONE MLS-1200MEGA (MDS-1000/6, 100ml TFM分解容器, MCR-6E)
- ② ICP-MS: 島津製作所製ICPMS-8500

7. 分析操作

分析操作のフローシートを図1に示す。なお、分析操作は、迅速性、汚染防止を優先して、メスフラスコ等の定容ガラス器具の使用を避けた。

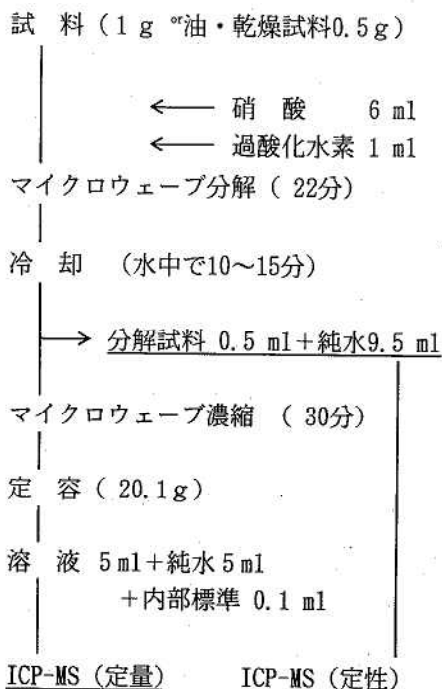


図1 分析法フローシート

7-1 試薬の調整

- ① Sc, Y, In, Bi, Tb内部標準液 ($10\mu\text{g/ml}$)
Sc, Y, In, Bi, Tb標準液 (1mg/ml) 各 0.5ml を、 0.5mol/L 硝酸約 40ml 入れた 50ml テフロン瓶にとり、 0.5mol/L 硝酸を加えて重量法で 50.84g とする。
- ② Te標準液 ($100\mu\text{g/ml}$)
Te標準液 (1mg/ml) 5ml を 6mol/L 塩酸約 40ml 入れた 50ml テフロン瓶にとり、 6mol/L 塩酸を加えて重量法で 55.0g とする。
- ③ Sn標準液 ($100\mu\text{g/ml}$)
Sn標準液 (1mg/ml) 5ml を 6mol/L 塩酸約 40ml 入れた 50ml テフロン瓶にとり、 6mol/L 塩酸を加えて重量法で 55.0g とする。
- ④ B標準液 ($100\mu\text{g/ml}$)
B標準液 (1mg/ml) 5ml を 0.1mol/L 硝酸約 40ml 入れた 50ml テフロン瓶にとり、 0.1mol/L 硝酸を加えて重量法で 50.18g とする。
- ⑤ 20元素混合標準溶液 ($1\mu\text{g/ml}$)
 $10\mu\text{g/ml}$ のEM社製 25種混合標準液を 1ml 、並びに $100\mu\text{g/ml}$ のB, Te, 及びSn標準液各 $100\mu\text{L}$ を 0.5mol/L 硝酸溶液を 5ml 入れたTPX試験管にとり、 0.5mol/L 硝酸を加えて 10.17g とする。用時調製する。

⑥ 0.5mol/L硝酸

超高純度硝酸（68%）16.4mlを、超純水を入れた500mlテフロン瓶にとり、あらかじめ印した500ml定容まで、超純水を加える。

⑦ 0.1 mol/L硝酸

超高純度硝酸（68%）3.28mlを、超純水を入れた500mlテフロン瓶にとり、あらかじめ印した500ml定容まで超純水を加える。

7-2 試料の分解・測定溶液の調整

TFM分解容器に試料を約1g（4群の油脂は0.5g、標準試料は0.25g）量り取り、超高純度硝酸6ml、超高純度過酸化水素1mlを添加する。マイクロウェーブ分解システムを使用して、表1の条件で分解後、冷水で10～15分冷却する。この段階で分解液0.5mlをTPX試験管に取り、超純水9.5mlを加え10mlとしたものをICP-MS用定性測定溶液（約160倍希釈溶液）とする。さらに、マイクロウェーブ濃縮システムを使用して、残りの分解液を表2の条件で濃縮し酸を除去（極少量酸が残る）した後、0.1mol/L硝酸約8mlを加えて加温溶解し、TPX試験管に移しさらに0.1mol/L硝酸で洗いこみ、重量法で20.1gとする。そのうち5mlをTPX試験管に取り、超純水5ml加える。さらに、内部標準（Sc, Y, In, Bi, Tb）10μg/mlを100μL加えて、ICP-MS定量用測定溶液（約40倍希釈溶液）とする。

表1 マイクロウェーブ分解条件

250W	1分
0W	1分
250W	5分
400W	5分
650W	5分
VENT	5分

表2 マイクロウェーブ濃縮条件

400W	20分
VENT	10分

なお、分解試料の濃縮に時間を要するため、迅速性を優先して、分解・濃縮の途中で分解液約8mlから定性用試料0.5ml採取するため、分解後の重量（容器+分解液）を量り、あらかじめ量った分解容

器の重量を減算して、分解溶液の重量を求めて補正する。

7-3 ICP-MSによる測定

(1) 定性分析

装置の定性分析(2)の条件で、ICP-MSにより分析可能な全元素（約60）について定性分析を行う。

(2) 定量分析

ICP-MSの測定条件を表3に示す

表3 ICP-MS測定条件

プラズマ条件			
高周波出力		1.2 kw	
サンプリング深さ		5.0 mm	
クーラントガス流量		7.0 L/min	
プラズマガス流量		1.5 L/min	
キャリアガス流量		0.60 L/min	
元素	質量数	内標準	積分時間
B	11	Sc	1.0
Al	27	Sc	1.0
Sc	45		0.5
V	51	Sc	1.0
Cr	52	Sc	1.0
Mn	55	Sc	1.0
Co	59	Sc	1.0
Ni	60	Sc	1.0
Cu	65	Y	0.5
Zn	66	Y	0.5
As	75	Y	5.0
Se	82	Y	5.0
Y	89		0.5
Mo	98	Y	1.0
Cd	111	In	1.5
In	115		0.5
Sn	118	In	1.0
Sb	121	In	1.0
Te	130	Tb	1.0
Ba	138	Tb	1.0
Tb	159		0.5
Tl	205	Bi	1.0
Pb	208	Bi	1.0
Bi	209		0.5
U	238	Bi	1.0

① 検量線

1μg/ml混合標準溶液を0.1mol/L硝酸溶液を5ml入れたTPX試験管に0, 10, 100, 200μL取り、0.1mol/L硝酸溶液5.00, 4.99, 4.90, 4.80ml加えて10mlとした後、10μg/ml内部標準溶液

(Sc, Y, In, Bi, Tb) を100 μ L加えて0, 1, 10, 20 μ g/L検量線溶液を調整した。

8. 添加回収試験

分解容器に採取した試料1 g(4群の油脂は0.5 g, 標準試料は0.25 g)に1 μ g/ml混合標準液0.5mlを添加して回収試験を行った。添加濃度は0.5 μ g/g(4群の油脂は1 μ g/g, 食品標準試料は2 μ g/g)となる。

III 結果及び考察

1 定性分析

定性分析は機器に内蔵されたデータベースを利用することにより、簡単にしかもすばやく未知試料のおおよその組成を知ることができ、対象試料と比較することで、原因究明の有力な手段となる。有害金属20元素(B, Al, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Sn, Sb, Te, Ba, Tl, Pb, U)を2 μ g/g添加した標準試料(レバー)の定性分析結果(半定量値)を図2に示す。

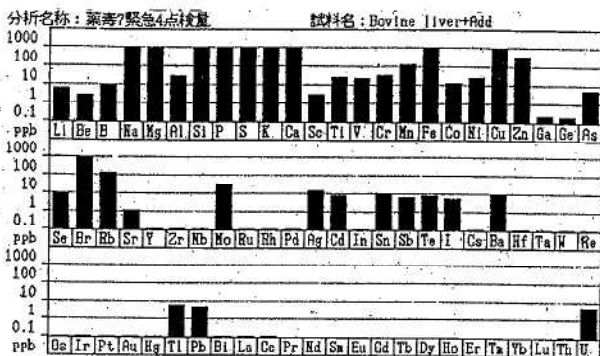


図2 有害金属20元素添加した標準試料(レバー)の定性分析例

20元素: B, Al, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As,

Se, Mo, Cd, Sn, Sb, Te, Ba, Tl, Pb, U

添加量: 2 mg/Kg(測定溶液中の添加濃度: 4 μ g/L)

2 定量分析

(1) 操作ブランク及び定量限界

超純水1 gを用いて、試料と同様の操作を日を変えて6回実施し、有害金属20元素の操作ブラン

ク値を求め、それらの標準偏差の10倍を定量限界として、表4に示す。急性毒性から考えて目標としている報告下限値0.5mg/kgを十分に満たしている。

表4 操作ブランクと定量限界 (単位: mg/Kg)

元素	回数 n	平均値 \bar{x}	標準偏差 δ	定量限界 $\delta \times 10$
B	6	0.014	0.012	0.12
Al	6	0.023	0.014	0.15
V	6	0.041	0.022	0.23
Cr	6	0.001	0.001	0.02
Mn	6	0.000	0.000	<0.01
Co	6	0.001	0.001	0.02
Ni	6	0.004	0.004	0.04
Cu	6	0.002	0.004	0.04
Zn	6	0.005	0.010	0.11
As	6	0.002	0.004	0.04
Se	6	0.003	0.003	0.03
Mo	6	0.001	0.001	0.02
Cd	6	0.000	0.000	<0.01
Sn	6	0.004	0.004	0.05
Sb	6	0.000	0.000	<0.01
Te	6	0.001	0.001	<0.01
Ba	6	0.002	0.002	0.03
Tl	6	0.000	0.000	<0.01
Pb	6	0.000	0.001	<0.01
U	6	0.001	0.003	0.03

(2) 食品標準試料の分析結果

超純水及び食品標準試料 {①NIST 1568 a Rice Flour (米) ②NIST 1577b Bovine Liver (レバー)} 並びに、それらに有害金属20元素(B, Al, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Sn, Sb, Te, Ba, Tl, Pb, U)を各2 μ g/g添加した試料について、日を変えて本法で3回の繰り返し分析を行った。

食品標準試料の測定結果と保証値等との比較を表5示す。Mn, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Pbの測定値は、保証値・参考値に近い値(80~128%)であった。レバーのAlは参考値の28%であった。

また、超純水及び食品標準試料の添加回収結果を表6に示す。平均回収率はVが59~64%と低かったが、他の19元素の平均回収率は84~128%と良好であった。また、添加標準試料の20元素の測定値の変動係数は2~15%と良好であった。

表5 食品標準試料の測定結果

元素	米 (NIST 1568a Rice Flour)				レバー (NIST 1577b Bovine Liver)			
	平均値 n=3 mg/Kg	CV %	測定値/ 保証値 %	保証値 (参考値) mg/Kg	平均値 n=3 mg/Kg	CV %	測定値/ 保証値 %	保証値 (参考値) mg/Kg
Al	4.02	7	91	4.4 ±1.0	0.85	32	28	(3)
V	<0.9	-	-	(0.007)	<0.9	-	-	(0.123)
Mn	18.26	2	91	20 ±1.6	9.53	3	91	10.5 ±1.7
Co	0.02	4	120	(0.018)	0.25	3	-	-
Cu	2.64	4	110	2.4 ±0.3	128.73	7	80	160 ±8
Zn	22.38	4	115	19.4 ±0.5	114.73	17	90	127 ±16
As	0.35	5	122	0.29 ±0.03	0.10	15	192	(0.05)
Se	0.49	8	128	0.38 ±0.04	0.89	14	122	0.73 ±0.06
Mo	1.61	3	110	1.46 ±0.08	3.97	4	113	3.5 ±0.3
Cd	0.02	20	101	0.022 ±0.002	0.48	5	97	0.5 ±0.03
Sb	<0.04	-	-	(0.0005)	<0.04	-	-	(0.003)
Pb	<0.04	-	-	<0.010	0.12	10	93	0.129 ±0.004
U	<0.1	-	-	(0.0003)	<0.4	-	-	-

繰り返し測定回数：3回

表6 純水及び標準試料の添加回収結果

元素	超純水					米					レバー				
	試料	添加試料				試料	添加試料				試料	添加試料			
	測定値 の平均 mg/Kg	添加量 mg/Kg	測定値 の平均 mg/Kg	CV %	回収率 の平均 %	測定値 の平均 mg/Kg	添加量 mg/Kg	測定値 の平均 mg/Kg	CV %	回収率 の平均 %	測定値 の平均 mg/Kg	添加量 mg/Kg	測定値 の平均 mg/Kg	CV %	回収率 の平均 %
B	0.01	2.00	1.70	6	84	0.54	2.00	2.50	8	98	0.68	2.00	2.66	12	99
Al	0.04	2.00	2.05	8	101	4.02	2.00	5.77	6	87	0.85	2.00	2.71	8	93
V	0.06	2.00	1.23	2	59	0.07	2.00	1.33	4	63	0.11	2.00	1.39	2	64
Cr	0.00	2.00	1.97	3	98	0.08	2.00	2.20	5	106	0.50	2.00	2.41	3	96
Mn	0.00	2.00	2.00	3	100	18.26	2.00	20.01	4	-	9.53	2.00	11.34	4	91
Co	0.00	2.00	2.00	3	100	0.02	2.00	2.15	4	107	0.25	2.00	2.26	3	100
Ni	0.01	2.00	2.01	3	100	0.23	2.00	2.36	4	107	0.34	2.00	2.27	2	96
Cu	0.00	2.00	2.06	8	103	2.64	2.00	4.95	10	115	128.7	2.00	139.4	13	-
Zn	0.00	2.00	2.20	10	110	22.38	2.00	25.36	12	-	114.7	2.00	130.7	15	-
As	0.00	2.00	2.10	6	105	0.35	2.00	2.71	8	118	0.10	2.00	2.45	9	118
Se	0.00	2.00	2.20	8	110	0.49	2.00	2.96	10	124	0.89	2.00	3.45	11	128
Mo	0.00	2.00	1.95	4	97	1.61	2.00	3.71	4	105	3.97	2.00	6.14	5	109
Cd	0.00	2.00	2.03	5	101	0.02	2.00	2.01	4	99	0.48	2.00	2.49	4	100
Sn	0.01	2.00	1.92	2	96	0.01	2.00	1.72	6	86	0.06	2.00	2.01	4	97
Sb	0.00	2.00	2.02	4	101	0.00	2.00	1.27	3	63	0.00	2.00	2.12	1	106
Te	0.00	2.00	2.18	8	109	0.01	2.00	2.46	11	123	0.00	2.00	2.20	13	110
Ba	0.00	2.00	1.99	3	99	0.14	2.00	2.31	8	109	0.06	2.00	2.22	8	108
Tl	0.00	2.00	1.97	3	99	0.00	2.00	1.90	4	95	0.00	2.00	2.04	2	102
Pb	0.00	2.00	1.96	2	98	0.01	2.00	1.87	4	93	0.12	2.00	2.09	2	99
U	0.00	2.00	1.88	5	94	0.00	2.00	1.78	4	89	0.00	2.00	1.97	5	98

試料及び添加試料の繰り返し測定回数：3回

(3) 実試料の添加回収実験

本法の食品試料への適用性を検討するため、13種類の食品群（トータルダイエット試料）に有害金属20元素を各0.5 µg/g添加した試料について、回収実験の結果を表7に示す。

13食品20元素 (B, Al, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Sn, Sb, Te, Ba, Tl, Pb, U) の回収率は52~146%で、回収結果のデータ数の92

%が回収率70~120%と良好であった。また、元素別の回収率は、Al, Cr, Co, Ni, Cu, Cd, Sn, Sb, Te, Tl, Pbは70~119%と良好な結果が得られた。しかし、As, Se, Mo, Ba, Uは81~146%, Bは75~132%, Mnは61~128%, Znは59~145%とバラツキがやや大きかった。また、Vは全体的に回収率が悪く52~77%の低値を示した。なお、食品中に添加量の4倍以上含有する元素は回収率を計算

しなかった。

表7 食品試料の添加回収率結果

元素	添加量 mg/Kg	トータルダイエツト試料の回収率 (%)															
		1群	2群	3群	4群	5群	6群	7群	8群	9群	10群	11群	12群	13群	最大	最小	平均
B	0.5	87	84	93	111	-	104	125	-	75	87	83	132	94	132	75	98
Al	0.5	92	97	-	97	109	87	109	71	70	-	119	97	-	119	70	95
V	0.5	77	77	53	73	57	56	61	58	65	70	52	75	53	77	52	64
Cr	0.5	101	99	100	93	95	71	104	95	91	95	95	111	97	111	71	96
Mn	0.5	128	95	103	99	-	97	-	61	86	91	97	114	82	128	61	96
Co	0.5	100	98	102	87	98	99	107	99	88	103	99	115	96	115	87	99
Ni	0.5	99	96	99	88	88	83	102	91	79	90	96	115	90	115	79	94
Cu	0.5	94	97	101	98	96	92	107	90	77	103	101	124	91	124	77	98
Zn	0.5	-	108	-	145	-	85	-	-	59	-	-	-	86	145	59	96
As	0.5	93	106	111	106	97	95	112	98	92	117	105	134	100	134	92	105
Se	0.5	88	108	114	115	87	87	108	100	81	118	109	142	95	142	81	104
Mo	0.5	99	101	105	94	111	103	110	103	99	110	101	122	103	122	94	105
Cd	0.5	90	97	95	94	82	92	95	88	80	91	96	100	91	100	80	92
Sn	0.5	90	88	82	81	97	89	90	87	84	98	94	96	70	98	70	88
Sb	0.5	97	95	79	93	93	102	95	94	95	96	99	105	97	105	79	95
Te	0.5	89	102	104	97	84	85	103	95	75	104	98	118	83	118	75	95
Ba	0.5	99	102	103	98	114	100	109	93	100	105	100	129	93	129	93	103
Tl	0.5	98	94	98	93	105	103	101	96	112	100	100	106	105	112	93	101
Pb	0.5	98	95	98	92	101	101	100	93	107	98	98	103	100	107	92	99
U	0.5	100	101	102	91	122	110	108	104	146	115	99	105	115	146	91	109

1群：米類 2群：雑穀・芋類 3群：砂糖・菓子 4群：油脂 5群：豆・豆加工品 6群：果実
7群：有色野菜類 8群：野菜・海藻類 9群：嗜好品 10群：魚介類 11群：肉・卵類 12群：乳・乳製品
13群：加工食品

3. 分析時間

- ① 定性分析全体に要する時間は、5検体で約2時間であった。うち、試料分解・冷却時間が5検体当たり約1時間、ICP-MS定性分析が1検体当たり5分である。
- ② 定量分析全体に要する時間は、5検体で約3時間であった。うち、試料分解・冷却時間が5検体当たり約1時間、濃縮・定容等が約1時間、ICP-MS定量分析が1検体当たり5分である。

- ② 食品標準試料(米及びレバー)に適用した結果、Mn, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Pbは、保証値・参考値に近い値(80~128%)であった。また、有害金属20元素を各2 μ g/g添加した試料の測定値の変動係数は2~15%、回収率は84~128%と良好であった。
- ③ 13食品群に20元素各0.5 μ g/g添加した試料の回収結果は、ほとんどが70~120%であった。
- ④ 分析に要する時間は5検体で定性分析が約2時間、定量分析が約3時間であった。

IV まとめ

急性食中毒発生時の薬毒物検査マニュアルを作成するため、マイクロウェーブ分解/誘導結合プラズマ質量分析法による食品中の有害金属の迅速定量方法を検討した。有害金属20元素(B, Al, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Sn, Sb, Te, Ba, Tl, Pb及びU)の迅速分析方法を確立できた。

- ① 定性分析により、未知試料のおおよその組成を知ることが可能であった。

V 参考文献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2000, p52-56, 金原出版, 2000
- 2) 日本薬学会編：薬毒物化学試験法と注解, p27-45, p367-410, 南山堂, 1992
- 3) 村上 隆元 後藤 良三：混入毒劇物の迅速測定法と人体中毒症状, p114-137, サイエンスフォーラム, 1999
- 4) 河口広司, 中原武利 編：プラズマイオン源質量分析計, 学会出版センター, 1994.