

## コメ中の無機ヒ素の分析法（LC-ICP-MS法）の室間共同試験

○浮穴学宗<sup>1</sup>、松本衣里<sup>2</sup>、西村勉<sup>2</sup>、山田友紀子<sup>1</sup>、

1 農林水産省 消費・安全局

2 (一財) 日本食品分析センター

### 【目的】

ヒ素は、火山活動等の自然現象や産業活動に伴って環境中に放出され、土壌や水中に広く存在する。ヒ素のように意図せず食品に含まれる有害化学物質については、食品の生産から消費にわたる過程で適切な対策を行い、その濃度を低減することが重要である。

現在、米中の無機ヒ素低減のための国際的な実施規範・基準値の検討が進みつつあり、これらに資するためにも国内で開発されたLC-ICP-MS法について、国際的な室間共同試験を行った。

### 【方法】

IUPAC/ISO/AOACの国際ハーモナイズドプロトコルに従った。

#### <分析法>

コメ粉末試料0.5gを硝酸抽出し、固相抽出等の前処理なしで、LC-ICP-MSに供し、As(III)、As(V)、モノメチルアルソン酸(MMA)、ジメチルアルシン酸(DMA)をそれぞれ定量し、As(III)とAs(V)の合計を無機ヒ素とする分析法である。

#### <参加分析機関>

インドネシア(1)、シンガポール(2)、タイ(5)、日本(8)の合計16試験所

#### <配付試料>

インディカ種及びジャポニカ種の玄米又は白米の粉末試料合計20検体(10試料の2反復)。高濃度ヒ素含有試料及びYuden Pairはヒ素溶液への米浸漬試料から調製した。AOAC

の技能試験プロトコルに従い、総ヒ素及び無機ヒ素の均質性を確認した。

### 【結果】

13試験所から報告された無機ヒ素の分析値を解析したところ、以下のとおり。

	10試料のまとめ
有効試験所数	12-13
外れ値データ数	0-2
無機ヒ素濃度 範囲(mg/kg)	0.030-0.681
RSDr (%)	3.8-7.7
RSDR (%)	10-36
HorRat	0.60-1.7

As(III)とAs(V)に関する回収率の一例

添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)		
	As(III)	As(V)	総無機 ヒ素
0.01	147	46	97
0.02	135	54	95
0.1	133	60	97

※As(III)とAs(V)を同濃度で添加。数字は3回の平均

### 【考察】

LC-ICP-MSを用いたコメ中の無機ヒ素定量分析法について、検出限界、定量限界、回収率及び室間再現精度等の性能パラメータに関し、コーデックス委員会の推奨している妥当な範囲に収まっており、国際的に通用する分析法であることが確認された。

ただし、As(III)とAs(V)を個別に定量した場合には分子種間の変換が課題である。

本試験の成果は、Journal of AOAC INTERNATIONAL 誌に掲載予定である。

## コメ中の無機ヒ素の分析法 (LC-ICP/MS法)の室間共同試験

○浮穴学宗<sup>1</sup>、松本衣里<sup>2</sup>、西村勉<sup>2</sup>、山田友紀子<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>農林水産省 消費・安全局  
<sup>2</sup>(一財)日本食品分析センター

### 1. コメ中の無機ヒ素について

### 2. コメ中無機ヒ素の定量分析法(LC-ICP/MS法)の室間共同試験

2

### コメ中のヒ素について

- ヒ素は環境中に微量、複数の化学形態で存在
- 国際的なリスク評価機関(JECFA)は、食品中のヒ素について、肺がんの発生率を0.5%増加させる無機ヒ素のBMDL<sub>0.5</sub>を3.0 µg/kg bw/dayと設定(2010)
- コメ中に主に存在するのは  
無機ヒ素: 3価(As(III))、5価(As(V))  
有機ヒ素: モノメチルアルソン酸(MMA)  
ジメチルアルシン酸(DMA)
- 第8回コーデックス委員会汚染物質部会は、**精米中の無機ヒ素の基準値案 0.2 mg/kg**を最終採択するよう総会に勧告することに合意

3

### 妥当性確認の必要性

#### 分析データを何に使うか

- 基準への適合性評価
- リスク管理の基礎  
リスクの推定、低減対策の検討など
- 国際機関へ提出  
GEMS/Food、Codex、JECFA

科学的に信頼出来るデータが必要

4

### 分析法の妥当性確認の方法

- 妥当性確認(validation)は、同じ方法(分析法プロトコル)で、同じサンプルを、複数の実験室で分析し、同じような分析値になるかどうかを調べる  
⇒ **一定のパラッキの範囲に入ることを確認**  
(室間共同試験、Collaboration study, Ring-test- trial)
- 定量分析の場合 8試験所以上  
(IUPAC/ISO/AOACのガイドラインの場合)  
- それぞれの試験所では、まったく同じ手順(分析法プロトコル)で分析操作を行う

5

### (参考) 室間共同試験プロトコルの比較

	IUPAC/ISO/AOAC	AOAC	ISO 5725-2
有効データ数	≥ 8 (例外的に5)	≥ 8 (定量分析) (例外的に5)	一般に 8-15
試料点数	≥ 5 (3)	≥ 5 (3)	通常 5
反復手順	記載あり	記載あり	—
外れ値検定			
Cochran test	P = 2.5% (片側) 外れ値があった場合、それを除外して繰り返し適用	P = 2.5% (片側)	P = 1.0% (片側) 外れ値があった場合、それを除外して繰り返し適用
single Grubbs test*	P = 2.5% (片側)	P = 2.5% (片側)	P = 1.0% (片側)
paired Grubbs test*	Two test statistics, P = 2.5% (片側) P = 1.25% (両側)	one test statistic P = 1.25% (片側)	one test statistic P = 1.0% (両側)
外れ値の除外	最大 2/9 まで	最大 2/9 まで	—

6

### 空間共同試験のデザイン

	設定	参考
共同試験 プロトコル	国際ハーモナイズド プロトコル	Horwitz, W. (1995) <i>Pure Appl. Chem.</i> 67, 331-343
参加試験所	16	インドネシア、シンガポール、 タイ、日本
使用した コメ試料	合計10種類 ・ジャポニカ:5 (玄米1、精米4) ・インディカ:5 (玄米1、精米4)	・5段階の濃度を設定 ・IUPACの技能試験プロトコ ル2006に従い、均一性確 認試験を実施 ・各2点(2反復)を配付
分析法SOP	西村らの分析法を SOP化	<i>Food Hyg. Saf. Sci.</i> Vol. 51, No.4, 178-181, 2010

### 使用したコメ試料

試料コード	種類	玄米/精米	総ヒ素(mg/kg)	無機ヒ素(mg/kg)
1Ab	Japonica	玄米	0.220	0.198
2Aw	Japonica	精米	0.082	0.076
3Aw1	Japonica	精米	0.279	0.191
4Aw2	Japonica	精米	0.278	0.182
5Aw3	Japonica	精米	1.06	0.637
6Bb	Indica	玄米	0.171	0.144
7Cw	Indica	精米	0.102	0.089
8Dw	Indica	精米	0.055	0.033
9Ew	Indica	精米	0.476	0.294
10Fw	Indica	精米	1.09	0.680

総ヒ素および無機ヒ素数値は、均一性確認試験の結果

### ヒ素添加試料の調製

各試料コード毎、コメ1 kg以上を用意

- 各試料コードに対応した下表の組成の溶液(20°C)中に 1時間浸漬後、ステンレスメッシュで溶液を除去。さらに、超純水(2 L)中に数秒間浸漬し、表面のヒ素を除去
- 30~35°Cで、水分含量が約20%になるまで乾燥。続いて、室温で水分含量が13.0~16.0%になるまで乾燥

表: コメ試料を浸漬した溶液の形態別ヒ素組成(μg As/kg)

試料コード	浸漬溶液	As(III)	As(V)	MMA	DMA
3Aw1	1	350	50	40	600
4Aw2	2	340	48.5	40	600
5Aw3	3	1600	200	160	2700
9Ew	4	700	100	80	1200
10Fw	5	1400	200	160	2400

### 分析法プロトコルの概要

コメ粉末試料(0.5 mm以下)

- 抽出: コメ粉末試料0.5 g、0.15 mol/L 硝酸、100°C、2 h.
- 超純水2 mL加え遠心分離(2000-2600 × g, 10 min)(2回)
- 上清を10 mLに定容

LC-ICP/MS

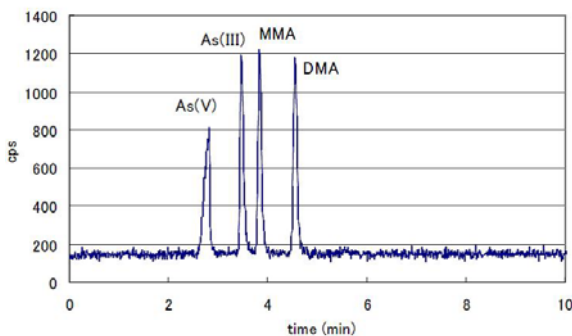
カラム: CAPCELL PAK C18MG, 5 μm, 4.6 mm i.d. x 250 mm  
カラム温度: 20~30°C

移動相: 10 mM 1-ブタンスルホン酸ナトリウム, 4 mM水酸化テトラメチルアンモニウム, 4 mMマロン酸, 0.05 %メタノール,  
pH 3.0 (硝酸で調整).

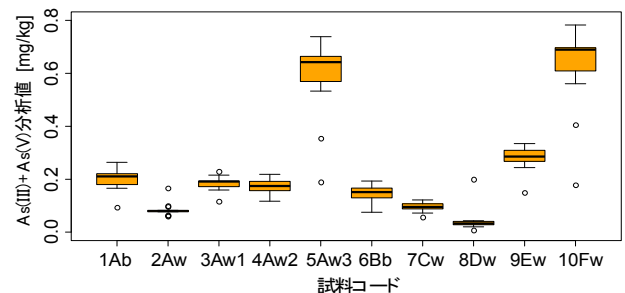
流速: 0.75 mL/min、試料注入量: 20 μL

ICP/MS: m/z 75, シングレイオンモニタリング

### LC-ICP/MSクロマトグラムの例

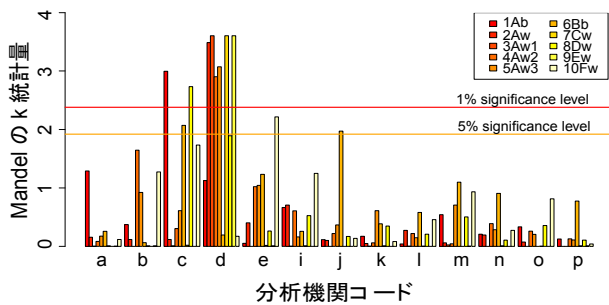


### 各分析試験所からの報告データの分布



箱ひげ図の太線は、中央値。箱の両端は、25%ile 又は75%ile  
ひげは箱の端から1.5 × IQRの範囲での最大値又は最小値

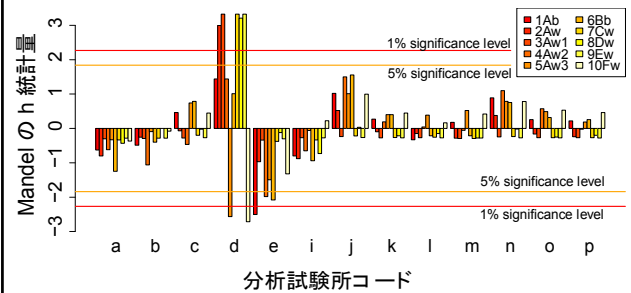
### 各分析試験所からの報告データのバラツキ(1)



Mandel の k 統計量 (ISO 5725-2)  
試験所内の分析値(2反復)の一致の程度を示す

13

### 各分析試験所からの報告データのバラツキ(2)



Mandel の h 統計量 (ISO 5725-2)  
試験所間の分析値の一致の程度を示す

14

### 分析法の性能データ

項目	数値
有効データ報告試験所数	12-13
外れ値数	0~2
無機ヒ素濃度範囲(mg/kg)	0.03-0.68
RSD <sub>r</sub> (%)	3.8-7.7
RSD <sub>R</sub> (%)	10-36
HorRat	0.6-1.7
検出限界 (mg/kg)	0.002
定量限界 (mg/kg)	0.02

回収率の例 ※As(III)とAs(V)を同濃度で添加。数字は3回の平均

添加濃度 (mg/kg)	As(III) 回収率 (%)	As(V) 回収率 (%)	総無機ヒ素 回収率 (%)
0.01	147	46	97
0.02	135	54	95
0.1	133	60	97

15

### 分析法の性能に関するガイドライン値(Codex)

Ratio	濃度	LOD (≤ mg/kg)	LOQ (≤ mg/kg)	RSD <sub>R</sub> (≤%)	回収率 (%)
10 <sup>-1</sup>	10% (100 g/kg)	10000	20000	6	98-102
10 <sup>-2</sup>	1% (10 g/kg)	1000	2000	8	97-103
10 <sup>-3</sup>	0.1% (1 g/kg)	100	200	12	95-105
10 <sup>-4</sup>	100 mg/kg	10	20	16	90-107
10 <sup>-5</sup>	10 mg/kg	1	2	22	80-110
10 <sup>-6</sup>	1 mg/kg	0.1	0.2	32	80-110
10 <sup>-7</sup>	0.1 mg/kg	0.01	0.02	44	80-110
10 <sup>-8</sup>	0.01 mg/kg	0.002	0.004	44	60-115
10 <sup>-9</sup>	0.001 mg/kg	0.0002	0.0004	44	40-120

Codex Procedural Manual, 21st ed., pp 65-73 16

### まとめ

- 我が国で開発された コメ中の無機ヒ素分析法 (LC-ICP-MS法) について、4カ国の分析試験所が参加して **国際室間共同試験**を実施
- 総無機ヒ素 (As(III)+As(V))、MMA、DMAを個別に定量できることを確認
- 総無機ヒ素について、**コーデックス委員会**が示す性能基準を満たすことを確認
- 室間共同試験の詳細及び分析法SOPは、Journal of AOAC INTERNATIONAL誌に掲載済み

<http://ingentaconnect.com/content/aoac/jaoac/pre-prints/content-9703Uken>

17