

## 6 飼料及び愛玩動物用飼料中の砒素、カドミウム、鉛及び水銀の誘導結合プラズマ質量分析計による迅速・多元素同時分析法の開発

林 菜月\*, 元木 太郎\*

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

HAYASHI Natsuki\* and MOTOKI Taro\*

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

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 nitric acid, hydrogen peroxide and gold solution to samples, they were processed by a microwave digestion system. 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 alfalfa hay and pet food which includes followings: semi-dry food for dogs; formed jerky for dogs and cats; dried jerky for dogs (hard type); dried jerky for dogs (soft type); confectionery for dogs; and milk powder for cats. The resulting mean recoveries ranged as following: 91.3 % to 109 % for arsenic; 94.5 % to 109 % for cadmium; 85.4 % to 106 % for lead; and 92.7 % to 104 % for mercury. The repeatability in the form of the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub>) was as following: less than 10 % for arsenic; less than 5.6 % for cadmium; less than 8.1 % for lead; and less than 2.1 % for mercury.

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of arsenic, cadmium, lead and mercury in the present method were determined as 0.02 mg/kg and 0.04 mg/kg, respectively.

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（砒素，カドミウム，鉛及び水銀）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。

有害重金属等の分析法としては，試料の灰化（砒素及び水銀を除く．）の後，酸による溶解を行い，砒素，カドミウム及び鉛については原子吸光光度計により測定，水銀については還元気化水銀測定装置により測定，愛玩動物用飼料中の無機砒素については液体クロマトグラフー誘導結合プラズマ質量分析計により測定する方法が飼料分析基準<sup>3)</sup>（以下「飼料分析基準法」という．）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．）に記載されている．これらの分析法は，

\* 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

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。そこで、平成30年度に田端ら<sup>5)</sup>は、肥料等試験法<sup>6)</sup>及びAOAC Official Method 2015.01<sup>7)</sup>を基に有害重金属等のICP-MSによる分析法を開発し、令和元年度に野村ら<sup>8)</sup>は、その分析法に一部変更を加え、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）に対する妥当性の検討を実施した。令和2年度に伊藤ら<sup>9)</sup>は、令和元年度に実施した選択性の確認において、本法及び飼料分析基準法から得られた定量値に差異が認められた稲わらについて原因究明を実施したが解明に至らなかった。また、乾牧草及び愛玩動物用飼料の一部（ジャーキー等）に対する妥当性を検討したところ、愛玩動物用飼料の一部（ジャーキー等）で良好な結果が得られなかった。

そこで、令和2年度に引き続き、稲わらで認められた定量値の差異について原因究明を実施した。また、愛玩動物用飼料の一部（ジャーキー等）について、妥当性確認で良好な結果が得られなかったことについての原因究明を実施した上で、選択性、真度、精度並びに定量下限及び検出下限を検討し、併せて、乾牧草について定量下限及び検出下限を検討したので、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	2 *	1	3	—

\* Total inorganic arsenic (iAs) [iAs (III) + iAs (V)] (come into force on October 1st, 2021)

## 2 実験方法

### 2.1 試料

乾牧草（アルファルファ乾草）及び稲わらは目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機 1 で粉砕し、稲わらについては、さらに目開き 0.25 mm のスクリーンを装着した粉砕機 2 で粉砕し、分析用試料とした。愛玩動物用飼料のセミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類は粉砕機 3 で粉砕後、それぞれ目開き 1 mm の篩を通過したものを分析用試料とした。このうち、有姿のままでは粉砕が困難な成形ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）は、はさみを用いて裁断したのち粉砕した。粉ミルクはそのまま分析用試料として用いた。

なお、検討に用いた愛玩動物用飼料を Table 2 に示した。

Table 2 Ingredients list of pet foods used in the present study

Pet food types	Ingredients
Semi-dry food for dogs 1	Meats (chicken meal, Japanese black, native chicken, cartilage, etc.), white sugar, beans, wheat flour, defatted rice bran, bread crumbs, sugars, oils and fats, fishes (dried small sardines, etc.), dairy products (cheese, etc.), noodles, dietary fibers, potatoes, vegetables (carrot, broccoli, tomato, pumpkin, etc.), glucosamine (crab-derived), shark cartilage extract (chondroitin-containing), thickening stabilizer (glycerin), minerals (calcium phosphate, calcium carbonate, potassium chloride, magnesium sulfate, sodium chloride, ferrous sulfate, zinc carbonate, copper sulfate, manganese carbonate, calcium iodate), quality improving agent (propylene glycol), preservative (potassium sorbate), vitamins (choline, V. C, V. E, nicotinic acid, pantothenic acid, V. A, V. B <sub>6</sub> , V. B <sub>1</sub> , V. B <sub>2</sub> , V. B <sub>12</sub> , folic acid, V. D), amino acids (L-lysine hydrochloride), acidity regulator, food colors (titanium dioxide, tartrazine, allura red AC, brilliant blue FCF), antioxidants (sodium erythorbate, tocopherol mixture, rosemary extract), flavor
Semi-dry food for dogs 2	Chicken, defatted soybean, corn starch, D-sorbitol, modified starch, glycerin, minerals (Ca, P, Zn, Na, Cu, I), sodium lactate, perilla seasoning, egg yolk powder, sugar, flavor, salt, thickening stabilizer (guar gum), acidity regulator, preservatives (sorbic acid), oil, antioxidant (extracted V. E), vitamins (V.A, V. E, V. D, calcium pantothenate, V. B <sub>12</sub> , V. B <sub>2</sub> ), shark cartilage powder, glucosamine, yeast
Formed jerky for dogs	Horse meat, dried mashed potato, sorbitol, starch degradation product, starches, glycerin, casein sodium, ginseng, ganoderma lucidum, royal jelly, chondroitin, glucosamine, oyster shell, adlay, antler, pit viper powder, fish bone, rosemary extracts, preservative (potassium sorbate), sodium phosphate, antioxidants (V. C, V. E)
Formed jerky for dogs and cats	Meats (chicken, chicken breast tender), wheat flour, sugars, starch (wheat starch), beans, sorbitol, glycerin, minerals (Na), acidulant, phosphate (Na), preservative (potassium sorbate), antioxidant (V. C), color former (sodium nitrite), food colors (tartrazine, acid red), seasoning
Dried jerky for dogs (hard type)	Chicken breast tender, preservative (potassium sorbate), antioxidant (sodium sulfate), color former (sodium nitrite)
Dried jerky for dogs and cats (hard type)	Anchovy, antioxidant (V. E)
Dried jerky for dogs (soft type)	Chicken breast tender, glycerine, preservative (potassium sorbate), antioxidant (sodium metabisulfite)
Confectionery for dogs	Wheat flour, egg, white sugar, vegetable oil, corn starch, skim milk, casein, brewery yeast, canola oil, oligosaccharide, polysaccharide thickener, glucosamine, salt, minerals (Ca, etc.), vitamins (V. E, V. C, etc.)
Confectionery for dogs and cats	Potato, salmon, white fish, cellulose, tomato, fish digest, vegetable oil, animal fat, salt, L-carnitine, glucosamine, yucca extracts, vitamins (V. A, V. D, V. E, V. B <sub>1</sub> , V. B <sub>6</sub> , pantothenic acid, niacin, folic acid, V. B <sub>2</sub> , V. K, biotin, choline, V. B <sub>12</sub> ), minerals (Ca, Mn, Cu, Zn, K, Fe, Se), antioxidants (tocopherol, citric acid, rosemary extracts)
Milk powder for cats	Milk protein, animal fat, dried skim milk, vegetable oil, egg yolk powder, milk oligosaccharide, dried yeast, acidity regulator, emulsifier, taurine, L-arginine, L-cystine, DHA, vitamins (V. A, V. D, V. E, V. B <sub>1</sub> , V. B <sub>2</sub> , pantothenic acid, niacin, V. B <sub>6</sub> , folic acid, carotene, biotin, V. B <sub>12</sub> , V. C, choline), minerals (Ca, P, K, Na, Cl, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Se), nucleotide, flavor (milk cream)

## 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 (富士フィルム和光純薬製) を用いた。2.5 の検討において、塩酸、硝酸及び過塩素酸は有害金属測定用 (富士フィルム和光純薬製) 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 10 mg を水 895 mL に溶かし、これに塩酸 25 mL, 酢酸 30 mL 及び硝酸 50 mL を加えた。
- 3) 標準原液  
砒素、カドミウム、鉛、水銀、レニウム、ロジウム及び金の標準原液は、Table 3 に示した供給業者、規格のものをを用いた。

## 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 の定容用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）。

## 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 の定容用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）。さらに混合内標準原液 300  $\mu\text{L}$  を 15 mL の定容用チューブに入れ，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）。

## 6) 金溶液

金標準原液 1.5 mL を 15 mL の定容用チューブに入れ，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）。

## 7) 重金属等混合標準液

重金属等混合標準原液，混合内標準液及び金溶液の一定量を 15 mL の定容用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 0.05，0.1，0.4，0.8，2，6 及び 10 ng，各内標準として 1 ng 並びに金として 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 及び金として 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。

測定する際には，Labcon 製チューブに重金属等混合標準液を移した。

Table 3 Standards used in the present study

Heavy metals and others	Guaranteed value ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Manufacturer	Specification
Arsenic standard solution	99.6	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Cadmium standard solution	100.0 100.6	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Lead standard solution	100.3	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Mercury standard solution	100.3 100.7	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Rhenium standard solution	1003	Acros Organics	for atomic absorption spectrochemical analysis
Rhodium standard solution	996	Kanto Chemical	for atomic absorption spectrochemical analysis
Gold standard solution	1004	Kanto Chemical	for atomic absorption spectrochemical analysis

## 2.3 装置及び器具

### 1) 粉碎機：

粉碎機 1（稲わら及び乾牧草用）：

SM 100 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，回転数（仕様）1430 rpm）

粉碎機 2（稲わら用）：

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

粉碎機 3（愛玩動物用飼料用）：

GM 200 Retsch 製（使用時回転数 10000 rpm）

### 2) 高压分解容器：

テトラフルオロメタキシール製分解容器 XF100 Anton-Paar 製

テトラフルオロメタキシール製分解容器 SK-15ET 用 Milestone 製

### 3) マイクロ波分解装置：

Multiwave 3000 Anton Paar 製

ETHOS EASY Milestone 製

### 4) チューブ：

定容用チューブ：Digi TUBEs 15 mL, 50 mL ポリプロピレン SCP Science 製

Labcon 製チューブ：MetalFree Centrifuge Tubes with flat caps 15 mL ポリプロピレン Labcon 製

### 5) メンブランフィルター：DISMIC-25HP（孔径 0.20 $\mu\text{m}$ ，直径 25 mm，親水性 PTFE）東洋濾紙製

### 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 を正確に量って高压分解容器に入れ，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分解時の温度が約 200 °C となるよう分解プログラムを設定し試料を分解した。分解プログラムの設定は Table 4 に示すとおり。冷却後，分解液を 15 mL の定容用チューブに水で移し込み，更に定容用チューブの標線まで水を加え，1700 $\times$ 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 の定容用チューブに正確に入れ，希釈溶媒を定容用チューブの標線まで加え，必要に応じてメンブランフィルターでろ過し，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。

測定する際は，Labcon 製チューブに試料溶液及び空試験溶液を移した。

Table 4 Operation conditions of Anton Paar's and Milestone's microwave digestion

Step	Anton Paar	Milestone	Time (min)
	Power (W)	Temperature (°C)	
Step 1 (Heating)	0 → 1400	30 → 200	10
Step 2 (Fixed electric power)	1400	200	40
Step 3 (Cooling)	0	200 → 30	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 5 に示した.

Table 5 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	$^{75}\text{As}$ ( $m/z$ 75), $^{114}\text{Cd}$ ( $m/z$ 114), $^{208}\text{Pb}$ ( $m/z$ 208), $^{202}\text{Hg}$ ( $m/z$ 208), $^{103}\text{Rh}$ ( $m/z$ 103), $^{187}\text{Re}$ ( $m/z$ 187)

## 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.

Sample 0.5 g (tetrafluoromethaxil vessel)

- added 5 mL of nitric acid and 2 mL of hydrogen peroxide
- added 0.4 mL of Au solution

Microwave digestion

- transferred the digested sample solution to 15 mL volumetric tube
- washed the tetrafluoromethaxil vessel with water
- transferred the water to the above 15 mL volumetric tube
- filled up to 15 mL with water
- centrifuged for 5 min at 1700×g
- transferred 3.75 mL of supernatant to 50 mL volumetric tube
- added 0.5 mL of internal standard (Rh, Re)
- filled up to 50 mL with a mixture of hydrochloric acid, acetic acid, nitric acid and water (5:6:10:179) containing 10 µg/mL L-cysteine acid
- filtered through a hydrophilic PTFE membrane filter (pore size: 0.20 µm)  
if necessary

ICP-MS

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

## 2.5 稲わら中のカドミウム分析法の検討方法

### 1) 灰化時の温度による定量値への影響の確認

令和元年度及び令和2年度の検討で用いた稲わらについて、5.0 gを100 mLのトールビーカーに入れ、基準値相当量のカドミウムを添加し、穏やかに加熱して炭化させた後、400 °Cで8時間及び15時間、480 °Cで15時間加熱して試料を灰化させた。その後、飼料分析基準第4章第1節12.2に従い操作し、試料中のカドミウム量を測定した。

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。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。

また、同時にカドミウム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、回収率はブランク値を差し引いて算出した。

### 2) 分解操作の改善方法の検討

稲わら2.0 gを500 mLのトールビーカーに入れ、2.5 mg/kg相当量のカドミウムを添加し、穏やかに加熱して炭化させた後、400 °Cで8時間加熱して試料を灰化させた。灰化した試料に硝酸5 mL及び過塩素酸5 mLを加え、時計皿で覆い、砂浴上でほとんど乾固するまで分解した。その後、飼料分析基準第4章第1節12.2に従い操作し、試料中のカドミウム量を測定した。

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。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。

また、同時にカドミウム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、回収率はブランク値を差し引いて算出した。

## 2.6 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。

乾牧草（アルファルファ乾草）及び愛玩動物用飼料（セミドライ製品（犬用）, 成型ジャーキ

一（犬猫用），素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ犬用及びソフトタイプ犬用），菓子類（犬用及び粉ミルク（猫用））について，各重金属等をそれぞれ添加後よく混合し，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。

また，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。

なお，愛玩動物用飼料への添加回収試験において，砒素の高濃度側の添加濃度は，改正前の総砒素としての基準値相当である 15 mg/kg とした。また，愛玩動物用飼料において水銀の基準値は定められていないため，高濃度側の添加濃度は，愛玩動物用飼料の原材料を考慮し，魚粉，肉粉及び肉骨粉の基準値相当である 1 mg/kg とした。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 稲わら中のカドミウム分析法の検討

令和元年度に実施した選択性の確認において，本法及び飼料分析基準法に従い稲わら中のカドミウムの定量値を求めたところ，それぞれ 0.211 mg/kg 及び 0.175 mg/kg となり<sup>8)</sup>，差異が見られたことから，1)及び2)により原因を調べるとともに，その改善方法を検討した。

##### 1) 灰化時の温度による定量値への影響の確認

2.5 の 1)に従い分析した結果，稲わらを 400 °C で 8 時間加熱した場合のブランク値は 0.183 mg/kg，回収率は 92.4 %，15 時間加熱した場合のブランク値は 0.188 mg/kg，回収率は 86.3 %，480 °C で 15 時間加熱した場合のブランク値は 0.134 mg/kg，その回収率は 58.3 %であり，温度が高いほど定量値及び回収率が低くなる傾向がみられた。なお，令和元年度の定量値（0.175 mg/kg）は，当センターで分析を行う際の設定値である 480 °C で 10 時間加熱したときの値である。

##### 2) 分解操作の改善方法の検討

1)の検討において，飼料分析基準法で定められた乾式分解の温度条件である 500 °C 以下であっても，温度が高すぎるとカドミウムの定量値及び回収率が低くなることがわかったが，この原因は，高温で加熱することで稲わらに含まれるケイ酸とカドミウムが結合し，水に不溶化したためと考えられた<sup>10)</sup>。一方で，温度を下げるとカドミウムの損失は小さくなるが，残存有機物を含まない灰分を得ることは非常に困難となる。飼料分析法・解説<sup>11)</sup>によると，試料の分解が不十分な場合，灰化後に硝酸及び過塩素酸を用いた湿式分解を行うこととしていることから，1)の検討においてカドミウムの損失が小さかった 400 °C で 8 時間灰化した稲わらについて，2.5 の 2)に従い湿式分解を追加して分析した。その結果，灰化後に湿式分解を追加した場合のブランク値は 0.215 mg/kg，回収率は 95.6 %であった。これは，1)で湿式分解をしなかった場合の定量値（0.183 mg/kg）よりも高くなり，本法の定量値（0.211 mg/kg）<sup>8)</sup>と同程度の値であった。

以上 1)及び 2)の結果について，本法及び飼料分析基準法で稲わら中のカドミウムの定量値に差異が見られた原因として，飼料分析基準法において，灰化時に稲わら由来のケイ酸とカドミウムが結合して不溶化した可能性が考えられたが，400 °C で灰化した後，硝酸及び過塩素酸で湿式分解をすることで，本法と同程度の定量値を得ることができた。

従って，本法により得られた定量値は自然汚染のものであり，定量に影響するような妨害はな

く、本法の選択性に問題はなかったと考えられた。

### 3.2 高压分解容器の洗浄方法の検討

令和2年度の検討において、愛玩動物用飼料（素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ犬用）及び粉ミルク（猫用））を用いた添加回収試験を実施した結果、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。）に定められた真度及び併行精度の目標値を満たさなかった。この原因の一つとして、高压分解容器に汚れが残留し、定量値に影響を与えていたことが考えられた。以前は、取扱説明書に従い、洗浄試薬として硝酸を用いてマイクロ波加熱による洗浄を行い、放冷後、超純水ですすいでいたが、本法の場合は硝酸のみでは洗浄が不十分となり、高压分解容器内部に重金属等が蓄積し、加熱時に再溶出することにより定量値にばらつきが出たと考えられた。そこで、高压分解容器の洗浄方法を次のとおりに変更し、その効果を確認した。洗浄試薬として王水又は逆王水を用い、マイクロ波分解装置の取扱説明書に従い、マイクロ波加熱による洗浄を行った。洗浄後は硝酸（1+3）に一晩浸漬した後、超純水ですすいだ。その結果、3.4で示すように良好な結果が得られ、王水又は逆王水を用いることで効果的に洗浄可能であることがわかった。

### 3.3 選択性の確認

愛玩動物用飼料のセミドライ製品（犬用）、成型ジャーキー（犬用）、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ犬猫用及びソフトタイプ犬用）、菓子類（犬猫用）及び粉ミルク（猫用）について、PF 検査法により重金属等が検出された試料の各 1 検体を本法により分析し、試料由来の妨害物質が各重金属等の定量に及ぼす影響を調査した。ただし、粉ミルクについては重金属等が検出された試料が無かったため不検出の試料を 1 検体用いた。

その結果は Table 6 のとおり、2 法で検出されたが定量値に差がある元素及び本法でのみ検出された元素があった。砒素については、成型ジャーキー（犬用）においては本法でのみ検出されたが PF 検査法の検出下限値未満の値であった。また、素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ犬用）の定量値は 2 法間で差が見られたが PF 検査法の定量下限値未満の値であった。カドミウムについては、粉ミルクにおいては本法でのみ検出されたが PF 検査法の検出下限未満の値であった。鉛については、すべての試料において本法でのみ検出されたが PF 検査法の検出下限未満の値であった。水銀については、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ犬猫用）の定量値は 2 法間で差が見られたが、PF 検査法の定量下限付近の値であった。また、セミドライ製品（犬用）、成型ジャーキー（犬用）及び素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ犬用）において本法でのみ水銀が検出されたが、いずれも PF 検査法の検出下限未満の値であった。以上の結果について、定量下限未満の値はばらつきがあることを考慮すると、本法により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、定量に影響するような妨害はなく、本法の選択性に問題はないと考えられた。

Table. 6 Quantitative results of this method and inspection method for pet food

Sample types	Analytical methods	Arsenic	Cadmium	Lead	Mercury
		Quantitative value (mg/kg)	Quantitative value (mg/kg)	Quantitative value (mg/kg)	Quantitative value (mg/kg)
Semi-dry type for dogs 1	This method	0.388 <sup>b)</sup>	0.054 <sup>b)</sup>	0.040 <sup>b)</sup>	0.003 <sup>b)</sup>
	Inspection method for pet foods	0.406	(0.080) <sup>a)</sup>	<LOD <sup>a)</sup>	<LOD <sup>a)</sup>
Formed jerky for dogs	This method	0.037 <sup>b)</sup>	0.060 <sup>b)</sup>	0.031 <sup>b)</sup>	0.001 <sup>b)</sup>
	Inspection method for pet foods	<LOD	(0.071) <sup>a)</sup>	<LOD <sup>a)</sup>	<LOD <sup>a)</sup>
Dried jerky for dogs and cats (hard type)	This method	7.65 <sup>b)</sup>	0.108 <sup>b)</sup>	0.103 <sup>b)</sup>	0.037 <sup>b)</sup>
	Inspection method for pet foods	7.62	0.100 <sup>a)</sup>	<LOD <sup>a)</sup>	0.062
Dried jerky for dogs (soft type)	This method	0.114	ND	0.008	0.004
	Inspection method for pet foods	(0.066)	<LOD <sup>a)</sup>	<LOD <sup>a)</sup>	<LOD
Confectionery for dogs and cats	This method	0.435 <sup>a)</sup>	0.160 <sup>a)</sup>	0.139 <sup>a)</sup>	0.033 <sup>a)</sup>
	Inspection method for pet foods	0.445	0.164 <sup>a)</sup>	<LOD <sup>a)</sup>	(0.024) <sup>a)</sup>
Milk powder for cats	This method	0.010	0.015	0.010	ND
	Inspection method for pet foods	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD <sup>a)</sup>
Analytical standards method and inspection method for pet food	Limit of quantification (LOQ) (mg/kg)	0.2	0.1	0.5	0.03
	Limit of detection (LOD) (mg/kg)	0.05	0.03	0.2	0.02

Except where noted: Mean ( $n = 1$ )

a) Mean ( $n = 2$ )

b) Mean ( $n = 3$ )

( ): Less than the limit of quantification

ND: Not detected

<LOD: Less than the limit of detection

### 3.4 添加回収試験

2.6 により添加回収試験を実施した。結果は、Table 7 のとおり、砒素については平均回収率 91.3~109 %，その繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 10 %以下，カドミウムについては平均回収率 94.5~109 %， $RSD_r$ は 5.6 %以下，鉛については平均回収率 85.4~106 %， $RSD_r$ は 8.1 %以下，水銀については平均回収率 92.7~104 %， $RSD_r$ は 2.1 %以下の成績が得られ，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。）及び PF 検査法の妥当性確認法に定められた 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 1 mg/kg, 3 mg/kg, 15 mg/kg)

## 2) 精度 :

22 %以下 (添加濃度 0.04 mg/kg)

16 %以下 (同 1 mg/kg)

14 %以下 (同 3 mg/kg)

11 %以下 (同 15 mg/kg)

Table 7 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)	(%)	(%)
Alfalfa hay	0.035	0.04	101	2.0	0.061	0.04	104	3.1
Semi-dry food for dogs 2	0.214	0.04	91.3	10	0.047	0.04	109	5.6
	0.167	15	102	1.1	0.043	1	97.7	0.8
Formed jerky for dogs and cats	0.007	0.04	99.6	2.4	0.025	0.04	102	1.3
	ND	15	98.2	1.1	0.020	1	94.7	0.2
Dried jerky for dogs (hard type)	0.011	0.04	103	2.5	ND	0.04	105	0.9
	ND	15	102	0.5	ND	1	98.9	0.7
Dried jerky for dogs (soft type)	0.114	0.04	109	3.9	ND	0.04	102	0.9
	0.083	15	101	1.9	ND	1	97.0	2.2
Confectionery for dogs	0.004	0.04	98.2	2.2	0.015	0.04	100	1.5
	ND	15	96.2	2.4	0.007	1	94.5	2.5
Milk powder for cats	0.010	0.04	101	2.1	0.015	0.04	106	1.0
	ND	15	103	0.5	0.008	1	100	0.8

  

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)	(%)	(%)
Alfalfa hay	0.039	0.04	85.4	2.3	0.004	0.04	95.3	1.4
Semi-dry food for dogs 2	0.147	0.04	106	8.1	ND	0.04	95.4	0.7
	0.139	3	95.4	0.7	ND	1	99.3	0.3
Formed jerky for dogs and cats	0.003	0.04	97.5	1.8	0.0001	0.04	93.0	0.9
	ND	3	95.9	2.6	ND	1	100	2.1
Dried jerky for dogs (hard type)	0.006	0.04	104	5.8	ND	0.04	92.7	0.9
	ND	3	97.4	0.5	ND	1	100	1.1
Dried jerky for dogs (soft type)	0.008	0.04	97.8	2.3	0.004	0.04	94.9	1.1
	0.002	3	97.6	1.5	ND	1	99.5	1.5
Confectionery for dogs	0.006	0.04	101	5.7	ND	0.04	94.9	0.8
	ND	3	96.4	1.9	ND	1	97.0	1.4
Milk powder for cats	0.010	0.04	96.8	3.8	ND	0.04	94.1	0.9
	0.002	3	98.2	0.5	ND	1	104	1.4

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

b) Relative standard deviation of repeatability

ND: Not detected

### 3.5 定量下限及び検出下限

乾牧草（アルファルファ乾草）及び愛玩動物用飼料（セミドライ製品（犬用）、成型ジャーキー（犬猫用）、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ犬用及びソフトタイプ犬用）、菓子類（犬用）及び粉ミルク（猫用））について、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乾牧草（稲わらを除く）中の重金属等の管理基準値に対して 1/10 以下及び 1/20 以下、愛玩動物用飼料の重金属等の基準値に対して 1/10 以下及び 1/20 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）
- 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）

## 4 まとめ

飼料分析基準法と本法とでカドミウムの定量値に差異が見られた稲わらについて、その原因究明を行った。また、平成 30 年度に開発し、令和元年度に一部変更を加えた有害重金属等の ICP-MS による迅速・多元素同時分析法の飼料及び愛玩動物用飼料への適用について検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 飼料分析基準法と本法とで稲わらのカドミウムの定量値に差異がみられた原因として、飼料分析基準法において、灰化時に稲わら由来のケイ酸とカドミウムが結合して不溶化したと考えられたが、400 °C で灰化後、硝酸及び過塩素酸で湿式分解をすることで、本法と同程度の定量値を得ることができた。従って、本法により得られた定量値は自然汚染のものであり、定量に影響するような妨害ではなく、本法の選択性に問題はなかったと考えられた。
- 2) 高压分解容器の洗浄試薬について、硝酸のみではなく、王水または逆王水を用いることが効果的であることがわかった。
- 3) 愛玩動物用飼料の一部（セミドライ製品（犬用）、成型ジャーキー（犬用）、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ犬猫用及びソフトタイプ犬用）、菓子類（犬猫用）及び粉ミルク（猫用））について、本法により試料中の各重金属等の量を算出した結果、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。
- 4) 乾牧草（アルファルファ乾草）及び愛玩動物用飼料の一部（セミドライ製品（犬用）、成型ジャーキー（犬猫用）、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ犬用及びソフトタイプ犬用）、菓子類（犬用）及び粉ミルク（猫用））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 消技第 1764 号 (2009).
- 5) 田端 麻里, 野村 昌代, 鈴木 知華: 飼料及び愛玩動物中の砒素, カドミウム, 鉛及び水銀の迅速・多元素同時定量法の開発, 飼料研究報告, 44, 95-104 (2019).
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) 野村 昌代, 伊藤 紗織, 田端 麻里: 飼料及び愛玩動物中の砒素, カドミウム, 鉛及び水銀の迅速・多元素同時定量法の開発, 飼料研究報告, 45, 67-83 (2020).
- 9) 伊藤 紗織, 林 菜月: 飼料及び愛玩動物中の砒素, カドミウム, 鉛及び水銀の迅速・多元素同時定量法の開発, 飼料研究報告, 46, 45-56 (2021).
- 10) 久保 彰治: 無機分析のための生体試料の分析法, 分析化学, 11, 864-871 (1964).
- 11) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター飼料分析基準研究会, 飼料分析法・解説, I, 95-100 (2009).