

※本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

# 食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

## ヒ素試験法（農産物）

## ヒ素試験法（農産物）の検討結果

### [諸言]

#### 1. 目的及び試験法の検討方針等

農産物(いちご、きゅうり、トマト、なつみかん、なつみかんの外果皮、日本なし、ばれいしょ、ぶどう、ほうれんそう、もも及びりんご)のヒ素は食品衛生法に基づく「食品、添加物などの規格基準」(昭和34年厚生省告示第370号)によって残留農薬規準値として定められており、通知試験法においてヒ素試験法にはグットツァイト法が指示されている。しかし、このグットツァイト法には有害試薬である臭化第二水銀を使用することから、第9版食品添加物公定書の改正に併せて当該方法が告示から削除される予定となっている。そこで、湿式灰化後に水素化物発生原子吸光法を用いた定量法にて農産物中のヒ素試験法への適用性を検討した。

#### 2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物： ヒ素（三酸化二ヒ素）

（参考）

分子式：  $\text{As}_2\text{O}_3$

分子量： 197.841 g/mol

外観： 白色の固体

融点： 312.2℃

沸点： 465℃

溶解性： 希酸、アルカリには溶けるが、有機溶媒には溶けない

水への溶解度： 20 g/L (25℃)

酸解離定数： 9.2 pKa

### 3. 基準値

農産物	基準値※
いちご	
きゅうり	
トマト	
なつみかん	1.0ppm
ばれいしょ	
ぶどう	
ほうれんそう	
もも	
なつみかんの外果皮	
日本なし	3.5ppm
りんご	

※三酸化ニヒ素として

#### [実験方法]

##### 1. 試料

東京都内の小売店を通じて購入した食品 11 品種を厚生労働省告示大四百九十九 食品の部 A に従って処理した後、包丁で細断し、粉砕機（Retsch 社製 GM200）を用いて磨碎均一化した。

- (1) いちご  
へたを除去したもの
- (2) きゅうり  
つるを除去したもの
- (3) トマト  
へたを除去したもの
- (4) 甘夏  
外果皮を除去したもの
- (5) 甘夏の外果皮  
へたを除去したもの
- (6) 日本なし  
花おち、しんおよび果梗の基部を除去したもの
- (7) ばれいしょ  
泥を水で軽く洗い落としたもの
- (8) ぶどう  
果梗を除去したもの

(9) ほうれんそう

赤色根部を含み、ひげ根及び変質葉を除去したもの

(10) もも

果皮および種子を除去したもの

(11) りんご

花おち、しんおよび果梗の基部を除去したもの

2. 試薬、試液 以下本文に記載する「水」はメルク株式会社製の超純水製造装置にて製造した超純水（比抵抗値 18.2 MΩ・cm 以上）を使用した。

硫酸（有害金属測定用、和光純薬工業株式会社製）

塩酸（ヒ素分析用、和光純薬工業株式会社製）

硝酸（有害金属測定用；密度 1.38、和光純薬工業株式会社製）

シュウ酸アンモニウム 1 水和物（和光純薬工業株式会社製）

ヨウ化カリウム（特級、和光純薬工業株式会社製）

テトラヒドロホウ酸ナトリウム（原子吸光分析用、和光純薬工業株式会社製）

ヨウ化カリウム（1→10）溶液：ヨウ化カリウム 10 g を取り、水を加えて 100 mL に定容した。

飽和シュウ酸アンモニウム溶液：シュウ酸アンモニウム 1 水和物 5g を取り、水を加えて 100 mL に定容した。

硫酸（1→20）溶液：硫酸 5 mL を正確に量り採り、適量の水が入った容器に入れた後、水を加えて 100 mL に定容した。

0.5%NaOH-0.4%テトラヒドロホウ酸ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 2.5 g を適量の水に溶解させた後、テトラヒドロホウ酸ナトリウム 2.0 g を量り入れ、水を加えて 500 mL に定容した。

塩酸（5→12）溶液：塩酸 200 mL を量り採り、水 280 mL を加え混合した。

ヒ素標準液：1000 mg/L（As として）、JCSS 規格（和光純薬工業株式会社製）

検量線用標準溶液：ヒ素標準液 0.5mL に硫酸（1→20）溶液を 1 mL 入れ、水で 100 mL に定容したものを水で適宜希釈して 1~10 ng/mL の濃度の溶液を調製した。

添加用標準液：ヒ素標準液を水で希釈して 0.1 mg/mL 溶液を調製した。

### 3. 装置

粉碎機：グラインドミックス（Retsch 社製 GM200）

ホットプレート：シャマルホットプレート（アズワン社製 HHP-4030）

原子吸光光度計：AA-7000（株式会社島津製作所製）

水素化物発生装置：HVG-1（株式会社島津製作所製）

#### 4. 測定条件

##### HG-AAS条件

セル	加熱吸収セル
検出波長	193.7 nm
反応溶液	0.5%NaOH-0.4%テトラヒドロホウ酸ナトリウム溶液 塩酸(5→12)溶液
光源	ホローカソードランプ
ガス圧	アセチレン: 0.09 Mpa Air: 0.35 Mpa アルゴン: 0.35 Mpa
ガス流量	燃焼ガス: 2.0 L/min 助燃ガス: 15.0 L/min

#### 5. 定量

ヒ素標準液 0.5 mL に硫酸 (1→20) 溶液を 1 mL 入れ、水で 100 mL に定容したものを水で適宜希釈して 1.00、1.25、2.50、5.00、10.00 ng/mL の濃度の溶液を調製した。この溶液 4 mL にヨウ化カリウム (1→10) 溶液 1 mL および塩酸 1 mL を混合し、70°C の水浴上で 4 分加温する。冷後、水で 20 mL に定容したものを水素化物発生装置原子吸光光度計に供し、得られた吸光度から検量線を作成した。試験溶液は 4 mL (甘夏の外皮、日本なし及びりんごは 1 mL) にヨウ化カリウム (1→10) 溶液 1 mL および塩酸 1 mL を混合し 70°C の水浴上で 4 分加温する。冷後水で 20 mL に定容したものを水素化物発生装置原子吸光光度計に供し、得られた吸光度を検量線に代入し、三酸化二ヒ素の濃度を算出した。得られた三酸化二ヒ素濃度から、農産物のヒ素含量 (ppm) を算出した。

#### 6. 試験溶液の調製

##### 試料分解

試料 20.0 g を量り採り、500 mL コニカルビーカーに入れ、硝酸 30 mL と水 20 mL を加えよく混合した後、時計皿で蓋をした。なお、添加回収試験には添加用標準液を終濃度が 1.0 ppm (なつみかん、日本なし及びりんごは 3.5 ppm) になるように添加した。その後ビーカーを 170°C で 1 時間加熱し、反応が穏やかであることを確認した後 200°C で 1 時間加熱し、その後室温で一晩静置した。その後、硫酸 10 mL を加え 170°C で 0.5 時間加熱した。反応が穏やかであることを確認した後、220°C で 2 時間加熱した。この間、反応液が黒色となったことを指標に硝酸を適宜加えた。さらに 250°C で 0.5 時間、300°C で 1 時間、350°C で 1 時間加熱し、反応液が黒色化するのを指標に硝酸を加え続けた。硝酸を加えた際の反応が穏やかであり、反応液が無色～淡黄色であることを指標とし、硫酸の白煙を生じるまで 350°C で加熱を続けた。その後室温にて放冷した。その後、飽和シュウ酸アンモニウム溶液を 25 mL、水を 75 mL 加え 350°C で硫酸の白煙を生じるまで加熱した。その後室温にて放冷し、得られた溶液を水で 100 mL に調製した。調製した溶液は水でさらに 10 倍希釈し、試験溶液とした。なお、酸の添加時を除く分解の全過程を通じ、時計皿にて分解容器に蓋をした。

[分析法フローチャート]

試料

↓

磨砕

↓

秤量

磨砕物 20.0 g

↓

↓硝酸 30 mL、水 20 mL

湿式分解

↓170℃、1時間

↓200℃、1時間

↓一晚静置

↓硫酸 10 mL

↓170℃、0.5時間

↓220℃、2時間

↓250℃、0.5時間

↓300℃、1時間

↓350℃、1時間(白煙硫酸が生じるまで)

↓飽和シュウ酸アンモニウム溶液 25 mL、水 75 mL

↓350℃、白煙硫酸が生じるまで

↓放冷

↓100 mLに定容

↓水で10倍希釈

予備還元

↓分解液4 mL(なつみかんの外果皮、日本なし、りんごは1 mL)

↓塩酸 1 mL、ヨウ化カリウム(1→10)溶液1 mL

↓70℃、4分

↓放冷

↓20 mLに定容

HG-AAS

} 溶液が黒色化するのを指標に適宜HNO<sub>3</sub>を加える  
(1回5~10 mL程度)

## [結果及び考察]

### 1. 予備還元後の溶液の安定性

本試験法は、塩酸存在下で予備還元を行うため、3 価に還元されたヒ素が揮散しやすいものと考えられる。そこで、ヒ素標準液および 11 食品の予備還元後の溶液の安定性について検証した。

まず、ヒ素標準液 (10 ng/mL) を予備還元後、常温で 0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、120、180、240 及び 300 分間室温で放置し、水素化物発生装置を装着した原子吸光度計で吸光度を測定して、放置時間が吸光度に与える影響について評価した (図 1)。その結果、30 分後までは予備還元直後 (0 分後) と比較して 98% と安定していたが、60 分後には 91% となり、300 分後には 47% にまで低下した。また、検量線作成用のヒ素標準液を予備還元後、0、30 及び 300 分間放置した溶液を用いて検量線を作成した結果、いずれも決定係数 ( $r^2$ )  $\geq 0.9996$  となり、放置時間によらず良好な直線性が得られた (図 2、表 1)。

次いで、残留農薬としてヒ素の基準が定められている 11 食品にその基準値濃度分のヒ素標準液を添加 (いちご、きゅうり、トマト、なつみかん、ばれいしょ、ぶどう、ほうれんそう及びももは 1.0 ppm、なつみかんの外果皮、日本なし及びりんごは 3.5 ppm) した試料の予備還元後の溶液を用いて放置時間が吸光度に与える影響について評価した。その結果、ヒ素標準液と同様の傾向を示し、30 分後までは 0 分後と比較して 98% 以上と安定していたが、300 分後には 39~44% まで低下した (図 3-1、3-2)。

以上の結果から、予備還元後は 3 価に還元されたヒ素が揮散しやすいため、30 分以内に測定を行う必要があると考えられた。

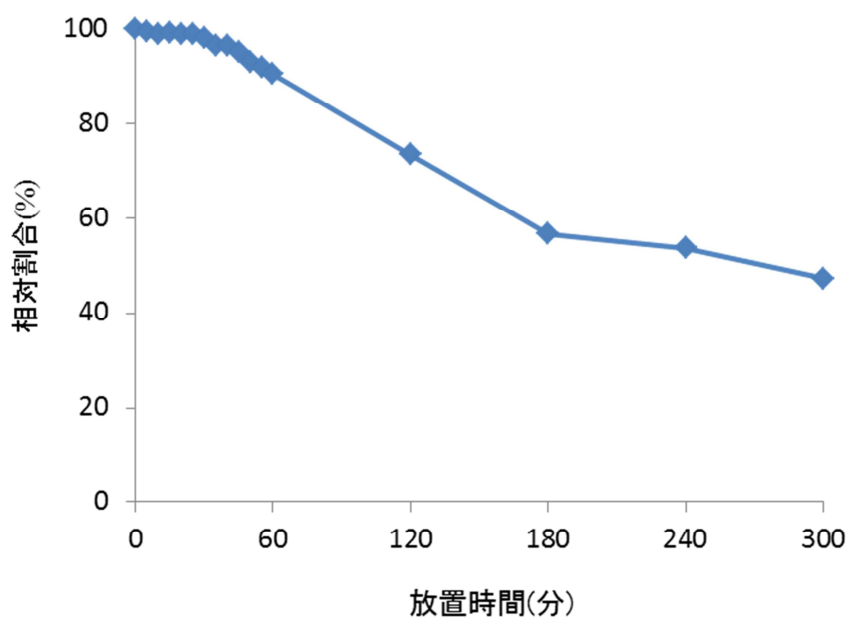


図1 ヒ素標準液（10 ng/mL）の予備還元後の放置時間による吸光度の変化

※相対割合は放置時間なし（0分後）を100%とした際の値



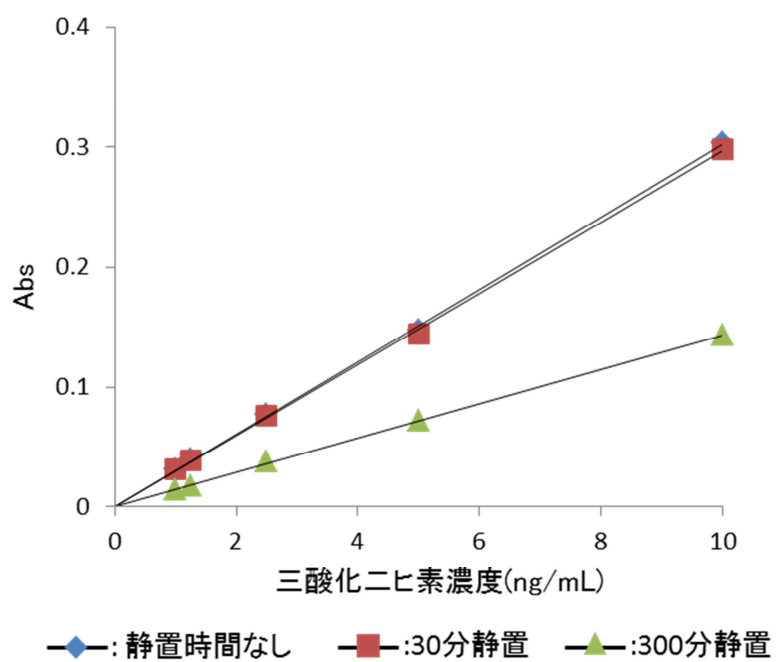


図 2 予備還元後の各放置時間における検量線

表 1 予備還元後の各放置時間における検量線の回帰式および決定係数

静置時間(分)	回帰式	決定係数
0	$y=0.0302x + 0.0007$	0.9996
30	$y=0.0296x + 0.0004$	0.9996
300	$y=0.0142x + 0.0001$	0.9998

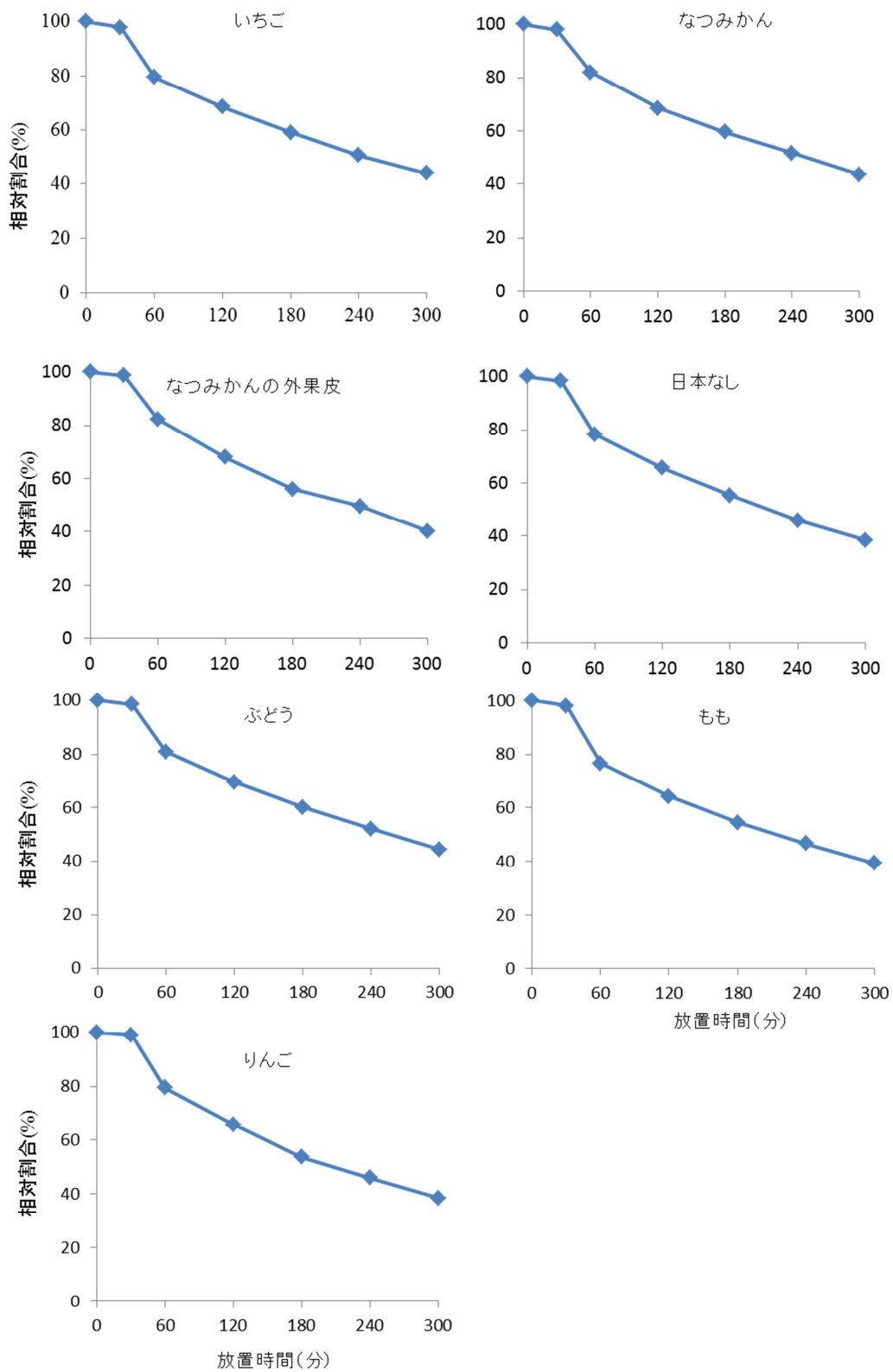


図 3-1 果実における予備還元後の放置時間による吸光度の変化

※相対割合は放置時間なし（0分後）を100%とした際の値

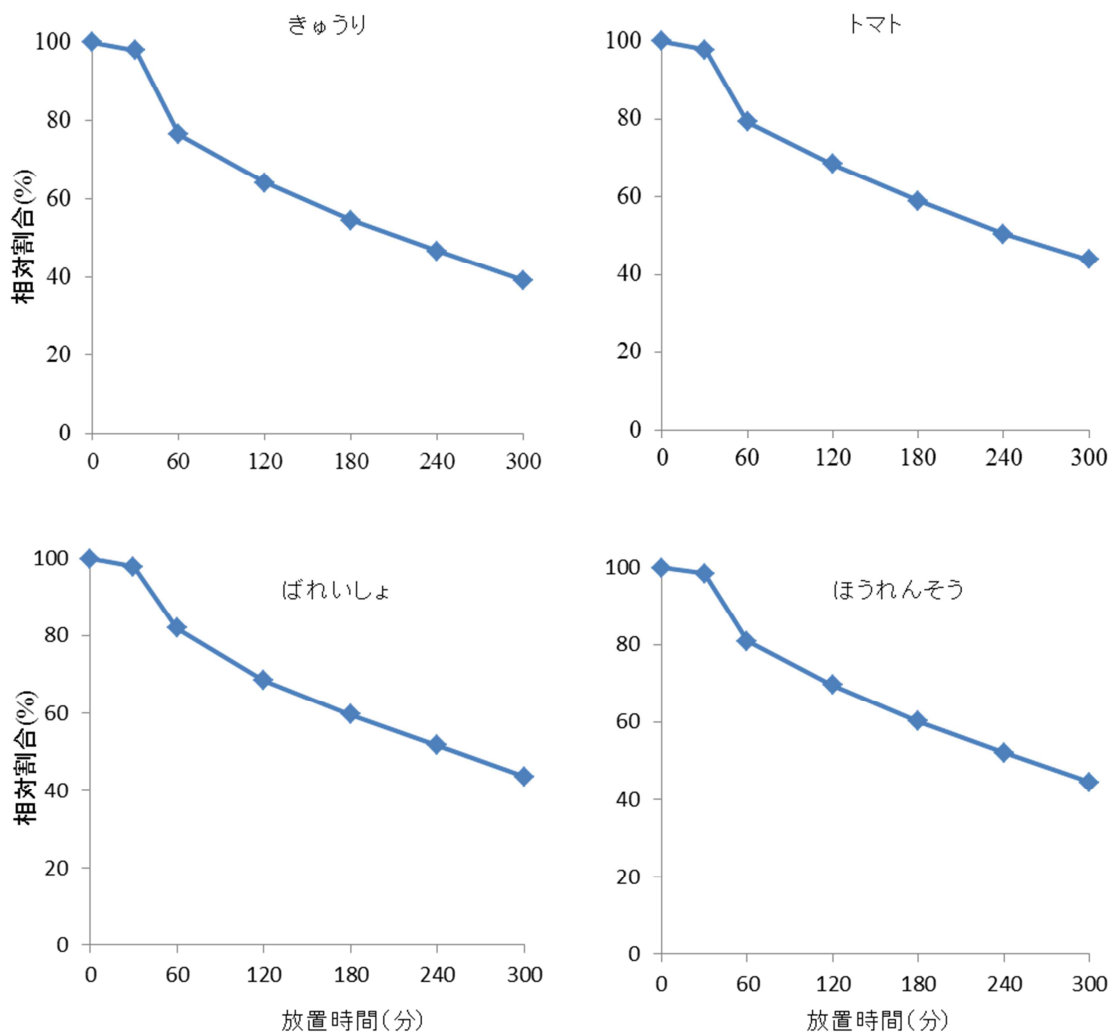


図 3-2 野菜における予備還元後の放置時間による吸光度の変化  
 ※相対割合は放置時間なし（0分後）を100%とした際の値

## 2. 添加回収試験結果

野菜・果実 11 食品を用いて基準値濃度で 5 併行の添加回収試験を行った。その結果、果実は真度 98.7~105.0%、併行精度 2.1~4.7% (表 2-1)、野菜は真度 100.9~105.4%、併行精度 2.7~3.1%と良好な結果が得られ (表 2-2)、いずれも「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」の目標値 (真度 70~120%、併行精度 10%未満) を満たした。検量線は、 $r^2 \geq 0.9997$  の良好な直線性が得られた (図 4)。これらの結果から、水素化物発生原子吸光法は農産物中のヒ素試験法として適用可能であると考えられた。

表 2-1 果実における添加回収試験結果

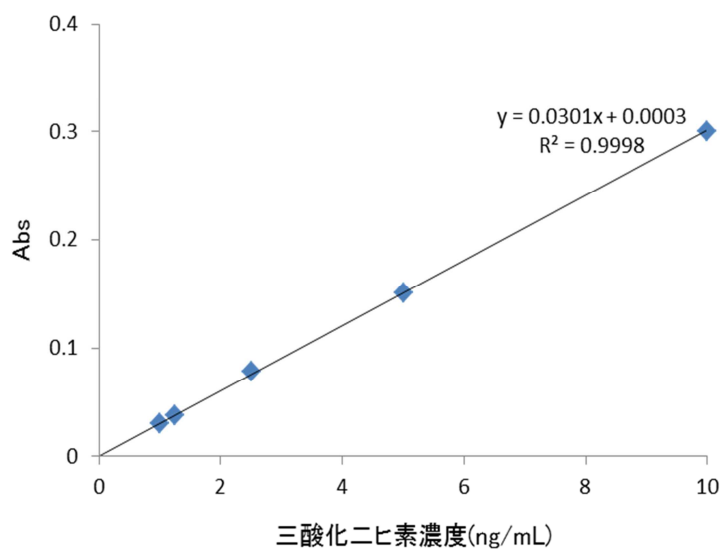
試料	試行回数	濃度(ppm)	平均値(ppm)	添加濃度(ppm)	真度(%)	標準偏差	併行精度(%)
いちご	Blank		0				
	1	1.03					
	2	0.98					
	3	1.01	1.01	1.00	101.19	0.03	3.23
	4	1.06					
	5	0.98					
なつみかん	Blank		0.11				
	1	0.96					
	2	0.93					
	3	1.03	1.00	1.00	100.42	0.05	4.65
	4	1.05					
	5	1.04					
なつみかんの 外果皮	Blank		0.21				
	1	3.67					
	2	3.71					
	3	3.74	3.68	3.50	105.01	0.08	2.26
	4	3.74					
	5	3.52					
日本なし	Blank		0				
	1	3.71					
	2	3.41					
	3	3.66	3.60	3.50	102.87	0.13	3.65
	4	3.48					
	5	3.74					
ぶどう	Blank		0				
	1	0.96					
	2	1.01					
	3	1.01	0.99	1.00	98.72	0.02	2.10
	4	0.98					
	5	0.97					
もも	Blank		0				
	1	1.09					
	2	1.08					
	3	1.06	1.05	1.00	104.62	0.03	3.31
	4	1.01					
	5	1.00					
りんご	Blank		0				
	1	3.45					
	2	3.41					
	3	3.66	3.54	3.50	101.05	0.09	2.57
	4	3.57					
	5	3.59					

表 2-2 野菜における添加回収試験結果

試料	試行回数	濃度(ppm)	平均値(ppm)	添加濃度(ppm)	真度(%)	標準偏差	併行精度(%)
きゅうり	Blank	0					
	1	1.01					
	2	1.08					
	3	1.09	1.05	1.00	105.40	0.03	2.76
	4	1.04					
	5	1.05					
トマト	Blank	0.05					
	1	1.03					
	2	1.05					
	3	0.97	1.01	1.00	100.94	0.03	3.07
	4	0.98					
	5	1.03					
ばれいしょ	Blank	0					
	1	1.07					
	2	1.06					
	3	1.03	1.03	1.00	103.49	0.03	2.72
	4	1.02					
	5	0.99					
ほうれんそう	Blank	0					
	1	1.07					
	2	1.05					
	3	1.01	1.03	1.00	103.07	0.03	2.65
	4	1.00					
	5	1.01					

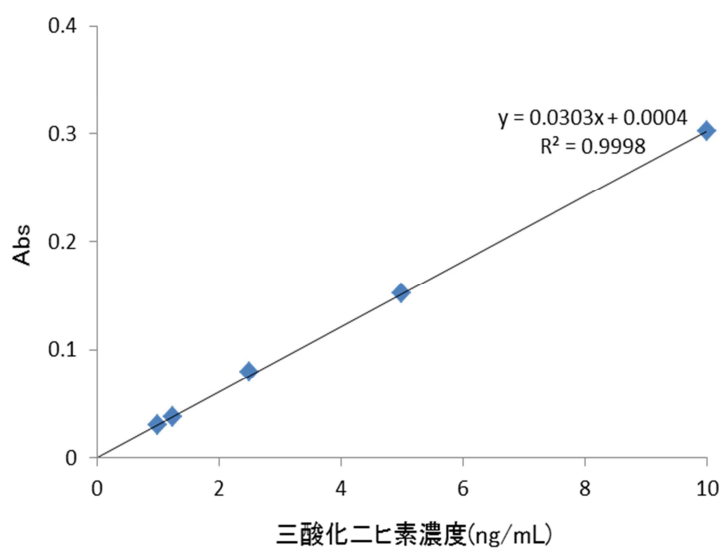
(a)

濃度(ng/mL)	Abs
0	-0.0011
1.00	0.0300
1.25	0.0375
2.50	0.0786
5.00	0.1505
10.00	0.3005



(b)

濃度(ng/mL)	Abs
0	-0.0009
1.00	0.0302
1.25	0.0377
2.50	0.0791
5.00	0.1515
10.00	0.3024



(c)

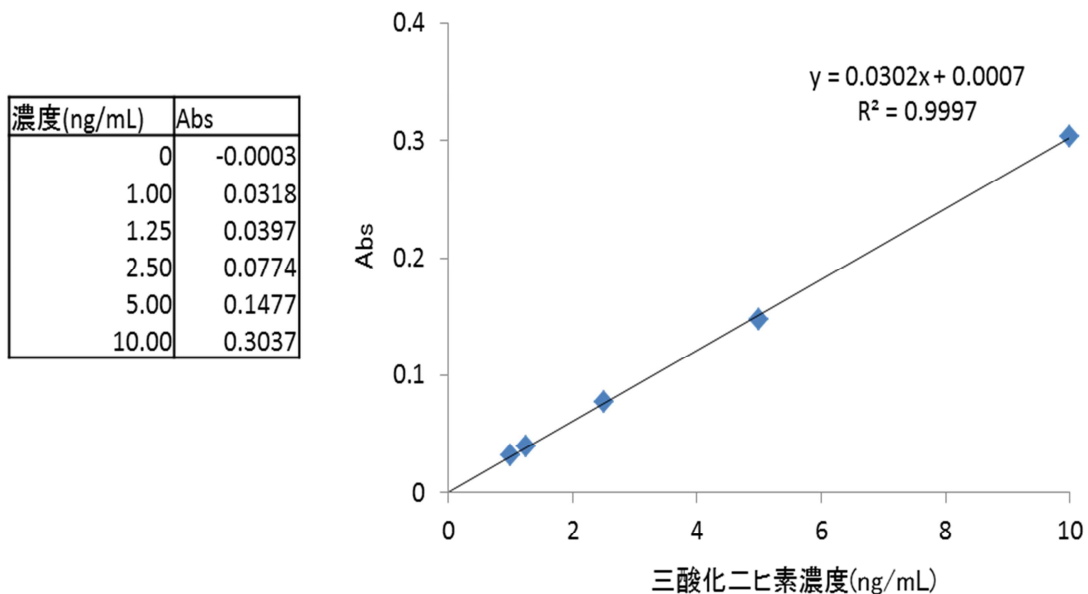


図4 ヒ素標準液を用いた検量線 (a): 一回目 (b): 二回目 (c): 三回目

※ 各検量線は別日に調製した標準溶液から作成

#### [結論]

農産物中のヒ素試験法として、試料から湿式分解法で抽出し、水素化物発生原子吸光法で定量する方法の適用性を検討した。予備還元後の溶液の安定性を検証した結果、放置時間を長くするとヒ素の揮散による吸光度の低下が認められたため、予備還元後は30分以内に測定する必要があると考えられた。本試験法をいちご、きゅうり、トマト、なつみかん、なつみかんの外果皮、日本なし、ばれいしょ、ぶどう、ほうれんそう、もも及びりんごの11食品に適用したところ、真度98.7~105.4%、併行精度2.1~4.7%と良好な結果が得られた。以上の結果より、水素化物発生原子吸光法は、現行の通知試験法で採用されているグットツァイト法に替わる農産物中のヒ素試験法として適用可能であると考えられた。

#### [参考文献]

- 1 片岡 洋平 渡邊 敬浩 林 智子 手島 玲子 松田 りえ子：清涼飲料水中の鉛，総ヒ素，カドミウムの一斉定量を目的としたICP-OES法，ICP-MS法，電気加熱式原子吸光法の開発 食衛誌 56, 88-95, (2015) .