
研究報文

食事からのカドミウムおよび鉛摂取量

第1編 原子吸光法による食事中カドミウムおよび鉛測定の検討

保元美保子, 今井 美子, 岩見 億丈*,
渡辺 孝男**, 池田 正之*, 新保慎一郎

Dietary Intake of Cadmium and Lead
Part 1. Determination of Cadmium and Lead in Diet
by Atomic Absorption Spectrometry

Mihoko Yasumoto, Yoshiko Imai, Okujou Iwami,
Takao Watanabe, Masayuki Ikeda and Shin-ichiro Shimbo

I. はじめに

食物摂取によって人体に有害な重金属が取り込まれることは、健康を考える上に重大な関心事である。我々は、陰膳方式食物収集による日本人の栄養調査¹⁾を日本各地で行っている。本研究はその一環として、食事からのカドミウムおよび鉛の摂取量の実態を明らかにするにあたって、採取食事検体中のカドミウムと鉛の測定法を、標準添加法を用いた原子吸光法により^{2, 3, 4, 5)} 検討した。

II. 方法

食事検体を湿式灰化後、フレイムレス原子吸光分光光度計を用いてカドミウムおよび鉛量の測定を行う。

1. 測定試料の作成：湿式灰化

収集した食事検体を食品別に秤量し、栄養計算の資料として記録したのち、検体すべてを大型ミキサーを用いて混合磨砕（必要に応じて再蒸留水を添加）し、粥状の磨砕物を得て分析用検体とした。

検体 6.0 g を秤量してテフロン製試験管にとり、濃硝酸 5.0 ml と硫酸 0.1 ml を加えて80°C 30分間加熱し、次いで温度を120°C に上げ、約3時間加熱後冷却する。温度が室温まで下がったことを確認した後、過塩素酸 2.0 ml・濃硝酸 5.0 ml を加え150～170°C で再加熱する。清澄な溶液（約0.3 ml）となったところで湿式灰化を完了する。放冷後に塩酸 0.1 ml, 濃硝酸 0.1 ml を加え、再蒸留水で液量を 10 ml に調整する。

2. 原子吸光法

測定用試料はカドミウム測定に際しては25倍に稀釈、鉛測定では原液または2倍に稀釈して用いる。標準添加用カドミウムは 0, 0.5, 1.0 $\mu\text{g/l}$ 溶液を、標準添加用鉛は 0, 20, 40 $\mu\text{g/l}$ 溶液を調整し、それぞれをオートサンプラー用容器に分注して測定に供する。ブランクについても測定試料と同様に稀釈する。

1) カドミウム測定

日立ゼーマン原子吸光装置（モデル Z-8100）にオートサンプラー（モデル ssc-220）を用い、フレイムレス原子吸光法により測定する。光源はカドミウムホロウカソードランプ（日立）、グラファイト炉はチューブタイプ（モデル180-7400）を用いる。

測定試料注入量は1回 20 μl 、標準添加法

京都女子大学家政学部食物栄養学科栄養学第一研究室

*京都大学医学部公衆衛生学教室

**宮城教育大学

表1 カドミウムの測定に用いた諸条件

A カドミウム測定条件

ランプ電流	: 7.5 mA	測定	: 標準添加
測定波長	: 228.8 nm	測定信号	: バックグラウンド補正 (ゼーマン補正)
スリット	: 1.3 nm	測定繰り返し回数	: 標準1, 未知1
キュベット	: チューブタイプ	演算方法	: ピーク高さ
加熱方法	: 光温度制御	ピーク幅の指定	: 10% (ピーク幅のみ)
試料量	: 20 μ l	濃度単位	: μ g/l
キャリアガス	: アルゴン	標準試料1	: 0.00
		標準試料2	: 0.50
		標準試料3	: 1.00

B カドミウム温度プログラム

測定段階	開始温度 (°C)	終了温度 (°C)	時間 (秒)	キャリアガス (ml/min)
乾燥 (RAMP mode)	80	120	30	200
灰化 (RAMP mode)	120	300	5	200
灰化 (STEP mode)	300	300	15	200
原子化 (STEP mode)	1600	1600	10	20
クリーン (STEP mode)	2400	2400	4	200

表2 鉛の測定に用いた諸条件

A 鉛測定条件

ランプ電流	: 7.5 mA	測定	: 標準添加
測定波長	: 283.3 nm	測定信号	: バックグラウンド補正 (ゼーマン補正)
スリット	: 1.3 nm	測定繰り返し回数	: 標準1, 未知1
キュベット	: チューブタイプ	演算方法	: ピーク高さ
加熱方法	: 光温度制御	ピーク幅の指定	: 10% (ピーク幅のみ)
試料量	: 20 μ l	濃度単位	: μ g/l
キャリアガス	: アルゴン	標準試料1	: 0.00
		標準試料2	: 25.0
		標準試料3	: 50.0

B 鉛温度プログラム

測定段階	開始温度 (°C)	終了温度 (°C)	時間 (秒)	キャリアガス (ml/min)
乾燥 (RAMP mode)	80	120	30	200
灰化 (RAMP mode)	120	400	5	200
灰化 (STEP mode)	400	400	15	200
原子化 (STEP mode)	2000	2000	7	20
クリーン (STEP mode)	2700	2700	5	200

(0, 0.5, 1.0 μ g/l カドミウム 20 μ l を炉内添加) で測定する。

カドミウム測定の条件設定は表1のごとく行う。
検量線作成は標準添加法による。吸光度を縦軸

に添加標準液濃度を横軸にとると、横軸を負の側で横切る検量線が得られる。検量線の相関係数が0.995以上の条件を満たした場合、検量線の延長が横軸と交わる点を測定濃度として換算する。

2) 鉛測定

カドミウムと同じく日立ゼーマン原子吸光装置(モデル Z-8100)にオートサンプラー(モデル ssc-220)を用い、フレイムレス原子吸光法により測定する。光源は鉛ホロウカソードランプ(日立)、グラファイト炉はチューブタイプ(モデル180-7400)を用いる。

鉛測定に際しては、あらかじめサンプラー容器に試料 400 μ l をとり、マトリックスモディファイア(33%硝酸アンモニウム溶液) 100 μ l を加えて、容器中でよく攪拌しておく。測定試料注入量は1回 20 μ l、標準添加法(0, 20, 40 μ g/l 鉛を 20 μ g 炉内添加)で測定する。

鉛測定の条件設定は表2のごとく行う。

検量線作成および測定値計算は、カドミウム測定と同様である。

III. 測定試料作成および測定法の検討

1. 湿式灰化²⁾

湿式灰化は、食事検体中のカドミウム・鉛等の元素をフレイムレス原子吸光法で測定するに際して、測定対象となる元素の損失を生ずることなく、分析の障害となる有機物を酸化力の大きい酸を用いて、比較的低温下に酸化分解して除去するために行われる前処理である。

1) 試薬

測定に使用する試薬は、すべて測定対象金属を含有しないか、または含有濃度が検定済みで、検査値に影響しない純度の高い有害金属測定用試薬(和光純薬)を用いる。1回の測定に使用する試薬の製造ロットナンバーはすべて統一することが必要である。

カドミウムおよび鉛の標準液は、原子吸光用カドミウム標準液(1,000 ppm, 和光純薬)、鉛標準液(1,000 ppm, 和光純薬)を用いた。

再蒸留水は脱イオン水を再蒸留し、カドミウム、鉛の含有について検討済みのものを用いた。

2) 湿式灰化処理手順^{2, 6)}

湿式灰化処理に用いるテフロン製試験管および湿式灰化後の試料を保存するための目盛付試験管(蓋付)は、あらかじめ重金属洗浄用洗剤(コンタミンL, 和研薬)と10%硝酸で洗浄した。

混合磨砕した食事検体 6.0 g をテフロン製試験管にとり、濃硝酸 5.0 ml、濃硫酸 0.1 ml を加える。食事検体と酸を緩やかに反応させるため、この状態で一昼夜放置する。

次に、ヒーターを用い80°C 30分加熱し、試験管内に固形物がなお残存する場合は、そのままの温度で加熱を継続する。

試験管内容が液体になれば、ヒータの温度を120°C に上げ、約3時間加熱する。

冷却後、過塩素酸 2.0 ml と濃硝酸 5.0 ml を加え、150~170°C で再加熱する。

テフロン試験管の底に、黄色透明な液体が約 0.3 ml 残った時点で加熱を中止し、放置冷却する。

冷却後、濃硝酸 0.1 ml と再蒸留水 4~5 ml を加え、30秒ほど再加熱する。

よく混合した後、試料保存用目盛付試験管に移して再蒸留水を加える。さらに測定対象金属の析出を防止するため塩酸 0.1 ml を加え、試料総量 10 ml に調整し蓋をして保存する。

3) 偏光ゼーマン吸光分光光度計(グラファイト炉原子化法)による測定

グラファイト炉を用いたフレイムレス原子吸光分光分析法による元素分析は、大別して検量線法、標準添加法、簡易標準添加法の3法が用いられているが、試料の状態によって使い分けられる。

今回の食事試料の測定は標準添加法を用いたが、それは測定する試料が食事であるため、各試料の干渉物質の濃度や種類が一定でないこと、測定対象の濃度にも大きいばらつきがあるなどの理由による。

A. 標準添加法⁶⁾

測定試料のカドミウムおよび鉛濃度を考慮し、その稀釈倍率と標準添加元素濃度について検討した。ここでは3点補正で測定した。

ブランクには試薬ブランクを用いた。再蒸留水を食事検体と同様に湿式灰化し、試薬ブランクを作成した。稀釈についても測定試料と同倍率として使用した。

測定は標準添加溶液を低濃度から測定し検量線を得るが、下記に注意する。

①検量線が直線を示す濃度域で測定する。

②添加標準液濃度は、測定試料中の目的元素濃度の2~5倍の濃度が望ましい。

③共存物質によっては干渉抑制が困難なことがある。

④目的元素と添加標準液内元素の化学種は同一にする。

表3 カドミウムの測定についての基礎実験

A 標準溶液の濃度による変化 (マトリックスモディファイア添加せず)

標準溶液の濃度	最終吸光度		
	再蒸留水	食事検体	
0, 0.5, 1.0 $\mu\text{g/l}$	0.118	0.18	0.20
0, 1.0, 2.0 $\mu\text{g/l}$	0.148	0.82	0.68

最終吸光度：1.0および 2.0 $\mu\text{g/l}$ 標準溶液添加後の吸光度

B マトリックスモディファイア (33%硝酸アンモニウム) の添加

	検量線の傾き	
	再蒸留水	食事検体
MD 添加	0.144	0.280
MD 不添加	0.144	0.103

(MD: マトリックスモディファイア)

⑤測定試料溶液の稀釈倍率は可能なかぎり高くする。

⑥光散乱, 分子吸収に起因するバックグラウンド吸収は抑制できないので, バックグラウンド吸収の補正は必ず行う。

標準添加法は, ①試料溶液の組成が全く不明のため, 検量線作成用標準溶液への共存物質の添加や干渉抑制剤の添加法が取れない, ②試料溶液の組成がある程度分かっている, 共存物質の種類や濃度が異なり, 干渉に差がある, ③比較的数多い試料を測定する場合, など検量線法で化学的, 物理的干渉を抑制できない試料の測定に有効であると考えられる。

B. カドミウム測定^{2, 3)}

a. 標準溶液による濃度と吸光度の直線性の検定
 添加標準溶液濃度の検定結果を表3に示した。炉内添加法では検量線の直線性は吸光度0.2までであるが, 2 $\mu\text{g/l}$ 添加した場合には吸光度は0.2より高くなるため, 標準溶液濃度は0, 0.5, 1.0 $\mu\text{g/l}$ を採用した。

b. マトリックスモディファイア (33%硝酸アンモニウム溶液)

マトリックスモディファイア添加は, 再蒸留水および食事検体について標準添加法を用いて検討した。マトリックスモディファイア未添加では検量線の差異がみられないが, マトリックスモディファイアを添加すると, 両者の検量線の差異が顕著となる

ため, カドミウム測定にはマトリックスモディファイアの添加をしないこととした。

c. 試料稀釈

標準添加法により食事試料を0.13N硝酸で稀釈して比較した。25倍稀釈で満足できる結果を得た。

以上の成績から, 通常の食事試料中カドミウム測定には, 標準添加法により3点補正を行い, 相関係数0.995以上の測定値で, 吸光度0.2以内に収まるよう, 試料も通常25倍稀釈し測定した。相関係数値を幾らにとるかは測定値の精度に関係する。理想的には相関係数が1.000であることが求められるが, グラファイトチューブの状態や操作上などの点を考慮して, 相関係数は0.995以上を定量条件として設定した。吸光度も0.2を越すと検量線が平低化し, 精度が劣る。測定試料の稀釈倍数25倍でも吸光度が0.2を越す場合があり, 更に稀釈倍率を高め測定した。

C. 鉛測定^{4, 5)}

鉛測定の場合カドミウムに較べ測定感度が劣るので, 試料そのままか2倍稀釈液を用いた。測定には陰イオンの干渉, 特に塩素イオンの干渉には注意が必要で, 対象が食事検体であるため食塩による影響について検討を加えた。

a. 食塩濃度と原子吸光測定灰化温度

食事検体測定灰化試料中の, 食塩濃度による鉛の原子吸光測定値への影響を, 極力小さくするための灰化温度条件を検討した。

- 検体1 0.1%食塩加食事検体
- 検体2 同上+鉛 50 μg
- 検体3 0.3%食塩加食事検体
- 検体4 同上+鉛 50 μg
- 検体5 試薬ブランク
- 検体6 同上+鉛 50 μg

以上の6検体の原子吸光測定灰化温度を, それぞれ400°C, 600°C, 800°Cに設定し標準添加法を用いて検討した。食塩濃度とは無関係に, 灰化温度400°Cが測定感度および安定性に優れていた。測定には原子吸光測定灰化温度400°Cを用いた (表4-A)。

b. パイロ化グラファイトチューブとノーマルグラファイトチューブの比較

ノーマルグラファイトチューブに代えてパイロ化チューブの使用を検討した。グラファイト炉原子化法では, 元素によって高温時のグラファイトと結合して, 高融点で難解離性の炭化物となり, 原子化効率が低下する恐れがある。パイロ化チューブはこの欠点を抑制するものであるが, 今回の検討では, 3

表 4 鉛の測定についての基礎実験

A 灰化温度による変化

(濃度変化)

	400°C	600°C	800°C
食塩濃度 (0.1%)	56.03	60.82	48.09
食塩濃度 (0.3%)	49.09	24.86	40.79
試薬ブランク溶液	66.00	43.23	63.84

($\mu\text{g/l}$)

(検量線の傾き)

	鉛 50 μg	400°C	600°C	800°C
食塩濃度 (0.1%)	—	0.108	0.107	0.099
	+	0.098	0.091	0.088
食塩濃度 (0.3%)	—	0.097	0.096	0.091
	+	0.098	0.110	0.077

B マトリックスモディファイアの種類による変化

		サンプル 1	サンプル 2	サンプル 3
濃 ($\mu\text{g/l}$) 度	①	47.82	41.84	48.84
	②	31.94	29.90	39.64
	③	41.29	42.08	43.88
検量線の傾き	①	0.082	0.159	0.175
	②	0.061	0.088	0.187
	③	0.133	0.177	0.218

① 33%硝酸アンモニウム ② 10%アンモニア EDTA ③ 10%リン酸カリウム
 サンプル 1 25倍稀釈 サンプル 2 50倍稀釈 サンプル 3 100倍稀釈
 濃度は換算値を用いた

C 硝酸アンモニウムとリン酸カリウムの陰イオン干渉抑制効果

	吸光度	レファレンス 1	レファレンス 2
硝酸アンモニウム	0.0212	0.110	0.083
リン酸カリウム	0.0336	0.415	0.285

	MDの種類	濃 度	レファレンス 1	レファレンス 2
サンプル 1	硝酸アンモニウム	28.67	0.165	0.139
	リン酸カリウム	48.15	0.522	0.250
サンプル 2	硝酸アンモニウム	59.36	0.175	0.115
	リン酸カリウム	71.06	0.428	0.155

D マトリックスモディファイア (33%硝酸アンモニウム) の添加方法による変化

		添 加 方 法	
		用 手	オートサンプラー
濃 度 ($\mu\text{g/l}$)	サンプル 1	1.50	6.06
	サンプル 2	23.85	64.74
検量線の傾き	サンプル 1	0.044	0.038
	サンプル 2	0.047	0.030
レファレンス	サンプル 1	0.088	0.117
	サンプル 2	0.089	0.123

サンプル 1 食事検体 サンプル 2 食事検体+鉛 50 μg

E マトリックスモディファイア (33%硝酸アンモニウム) 添加量による変化

		マトリックスモディファイア 添 加 割 合			
		a	b	c	d
		S: MD=1:1	S: MD=2:1	S: MD=3:2	S: MD=4:1
濃 度 ($\mu\text{g/l}$)	サンプル 1	60.36	54.93	37.25	45.49
	サンプル 2	63.52	56.27	—	50.40

(S: MD = 測定試料 : マトリックスモディファイア)

F キャリアガス流量による変化

流 量		濃 度 ($\mu\text{g/l}$)	検量線の傾き
20 ml/min	サンプル 1	1.50	0.044
	サンプル 2	23.85	0.048
30 ml/min	サンプル 1	1.33	0.030
	サンプル 2	23.91	0.036

サンプル 1 食事検体 サンプル 2 食事検体+鉛 50 μg

点補正による吸光度と濃度の対応が相関係数0.995に達せず、またレファレンス信号 (バックグラウンド吸収と僅かな原子吸収の和) が大きく、測定感度の低下もみられた。鉛の測定にはパイロ化チューブの効果は得られないことが明らかになった。

c. マトリックスモディファイア (陰イオンの干渉抑制剤) の検討

原子化の前段階の灰化温度は目的元素が飛散しないよう低めに抑えるが、塩類を多く含むマトリックスが複雑な測定試料においては、灰化温度を上げる必要がある。マトリックスモディファイアは陰イオンの干渉抑制剤のみならず、加えることにより測定目的元素の化合物形態が変化し高温での飛散が防御

できる。鉛測定ではマトリックスモディファイア使用の効果が期待できる。

測定試料とマトリックスモディファイアを4:1に混合し、標準添加法を用いて測定濃度をそれぞれ換算値で比較検討した。同時に試料を25, 50, 100倍稀釈して検量線の直線性についても検討した。

マトリックスモディファイアとして、33%硝酸アンモニウム、10%アンモニア EDTA、10%リン酸カリウムについて比較した。稀釈による検量線の変化の小さいこと、またレファレンス信号も小さいことから、33%硝酸アンモニウムが適していると判断した。10%リン酸カリウムは吸光度が高かったが、レファレンス信号も大きく不適とした(表 4-B, 4-C)

マトリックスモディファイアを測定試料に添加する際、手動的な炉外添加とオートサンプラーによる炉外添加について比較した。手動炉外添加による方が、検量線の直線性に勝り、レファレンス信号も小さく、測定時には手動的に炉外添加攪拌することとした(表4-D)。

マトリックスモディファイア添加量についての検討では、食事検体：マトリックスモディファイア4：1の場合に安定した成績を得たので採用した(表4-E)。

d. 原子化時のキャリアガス流量の検討

鉛の原子化段階でキャリアガス流量を増すと、キャリアガスによりグラファイト炉内での鉛の原子密度が稀釈され、吸光度の低下を生じる。一方、キャリアガス流量を少なくすると、原子化時の高温によりグラファイト炉の酸化等により劣化が進んでしまい、グラファイト炉の寿命が短くなる。従って、原子密度を高く維持し、かつ、グラファイト炉の長時間安定した性能の維持が期待できる。適当なキャリアガス流量の設定が望まれる。検討の結果、キャリアガス流量は20 ml/min を採用した(表4-F)。

IV. おわりに

原子吸光法による元素の微量測定は自動化が進み、その測定も比較的容易になったが、今回の検討で、試料、試薬の調整、測定方法の選び方など、なお多くの問題点を有することを指摘した。測定操作を進める上に十分な注意が望まれる。

文 献

- 1) 木村恵子, 今井美子, 河村佐規子, 山本久美子, 保元美保子, 新保慎一郎, 岩見億丈, 池田正之: 陰膳方式食物収集による日本人の栄養調査, 京都女子大学食物学会誌47: 19-25 1992
- 2) T. Watanabe, H. Fujita and M. Ikeda: A semiautomated system for analysis of metals in biological materials and its application to mass determination of cadmium in blood. *Toxicology Letters*, 13: 231-238 1982
- 3) T. Watanabe, A. Koizumi, H. Fujita, M. Kumai and M. Ikeda: Cadmium levels in the blood of inhabitants in nonpolluted areas in Japan with special reference to aging and smoking. *Environ. Res.*, 32: 472-483 1983
- 4) T. Watanabe, N. Ishida and M. Ikeda: Comparative study on determination of lead in blood by flame and flameless atomic absorption spectrophotometry with and without wet digestion. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 39: 121-126 1977
- 5) T. Watanabe, H. Fujita, A. Koizumi, K. Chiba, M. Miyasaka and M. Ikeda: Baseline level of blood lead concentration among Japanese farmers. *Arch. Environ. Health*, 40: 170-176 1985
- 6) 不破敬一郎, 下村 滋, 戸田昭三編, 最新原子吸光分析 I, pp 225-250, 廣川書店 1982