

水素化物発生法による肥料・飼料の総ヒ素分析における湿式分解温度の影響

青木孝一・安藤光一・久保田貴志

キーワード：肥飼料，有機態ヒ素，総ヒ素，魚粉，アルセノベタイン

I 緒 言

ヒ素は土壌、底質、海産生物等自然界に広く分布しており、毒性の高い元素として知られている。このため、肥料・飼料については、安全性の観点から総ヒ素としての基準値が定められている。

肥料・飼料の総ヒ素は、一般的には肥料等試験法（独立行政法人農林水産消費安全技術センター，2013）あるいは飼料分析基準（農林水産省，2012）に従い、湿式分解を行った後、水素化物発生法によって分析されている。これらの方法はいわゆる公定法またはこれに準ずる分析法として位置づけられ、新たな知見や研究論文をもとに、適宜改訂が行われている。

吉永・石黒（2004）は、魚粉のヒ素分析において、本来よりも定量値が低くなる事例があることから、硝酸、硫酸及び過塩素酸の湿式分解における硫酸量を、従来の1mLから5mLに変更することで、安定的に高い値になることを明らかにした。この報告をもとに、飼料分析法・解説-2004-（飼料分析基準研究会，2004）では、総ヒ素分析における湿式分解時の硫酸を5mLとする方法が採用されている。この研究では分解温度についての検討は行われていないが、飼料分析法・解説-2004-では、300℃～380℃で強熱分解することが注意書きとして記述されている。

浅尾ら（2008）は、汚泥肥料のヒ素分析において、肥料分析法（1992年版）では6時間と規定されている分解時間を約3時間に短縮できることを明らかにした。その後、杉村ら（2009）は、無機質肥料及び有機質肥料でも同様の短縮が可能であることを確認している。これらの研究を受けて、分解時間を3時間とする方法が2009年時点で肥料等試験法のホームページに掲載された（その後更新され現在は閲覧できない）。これら一連の研究では、温度の検討は行われていないが、300℃～380℃で分解が行われており、2009年時点の肥料等試験法にもこの分解温度が記載されている。

一方、吉永ら（2006）は、水素化ほう素ナトリウムで還元したアルシン類を、無機態、モノメチル体、ジメチル体、トリメチル体のヒ素に分別して定量する方法を報告してい

る。この研究では分解温度の検討が行われており、ジメチル体、トリメチル体は、200℃～250℃では分解されずに安定的に定量されることを明らかにしている。また、アルセノベタインに代表される有機ヒ素化合物には難分解性のものがあり、通常行われる200℃～250℃の湿式分解では無機化が不十分であることが報告されている（Narukawa et al., 2005；井上ら，2011）。

以上のように、肥料・飼料の水素化物発生法による総ヒ素分析においては、湿式分解の温度条件が大きく影響することが指摘されているが、これらの報告ではホットプレートの設定温度が硫酸の沸点を大きく上回るにもかかわらず、実際の分解液温を測定したデータがない。そのため、より安定的に総ヒ素を定量するには、分解液温の測定を含めたより詳細な温度条件の検討が必要と考えられた。本研究では、有機態ヒ素を含む魚粉及び各種肥料・飼料の総ヒ素分析における分解温度条件について詳細に検討した。

II 材料及び方法

試験 1. 魚粉の総ヒ素分析における分解温度及び分解時間の影響

飼料として流通している魚粉を試料とし、第1段階として、約200℃のサンドバス上で硝酸、過塩素酸、硫酸（いずれも試薬特級）による湿式分解を行い、大部分の有機物を無機化した後、第2段階として砂温を200℃、230℃及び260℃に設定して分解を行った。

すなわち、試料2gを300mL容トルビーカーに計りとり、硝酸約10 mL 及び硫酸約5 mL を加えて、第1段階として約200℃に設定した家庭用ホットプレート（東芝製HGT-35MK）のサンドバス上で時計皿を覆って1時間加熱した。放冷後、過塩素酸約5mLを加えて1時間加熱し、時計皿をずらしてさらに1時間加熱して、最終的に約5mLとした。この間、ビーカー内の分解液が炭化により黒変した場合は、硝酸約5mLを追加した。

第2段階の分解では、実験用ホットプレート（ADVANTEC製HTP-553AA）のサンドバスを用い、砂温を200℃、230℃及び260℃に調節する区（以下、それぞれ200℃区、230℃区及び260℃区）を設定した。各温度区は、サンドバスの砂中に水銀温度計の感温部を挿入し、指示値が200℃、230℃及

第1表 分解第1段階における分解開始後時間とピーカー下砂温及び分解液温 (°C)

	0～1時間	1～2時間	2～3時間
ピーカー下砂温	157±5.0	174±9.7	172±10.2
分解液温	114±3.4	124±6.8	129±9.1

注1) 0～1時間は硝酸10mLと硫酸5mLで時計皿を閉じた状態, 1～2時間は過塩素酸5mLを加え時計皿を閉じた状態, 2～3時間は時計皿をずらした状態.

2) 砂温及び液温は5分ごとの測定値の平均値と標準偏差.

第2表 分解第2段階の各分解設定温度及び各分解時間におけるピーカー下砂温及び分解液温 (°C)

	200°C区			230°C区			260°C区		
	30分	60分	90分	30分	60分	90分	30分	60分	90分
ピーカー下砂温	196±5.6	199±3.1	199±4.3	227±5.4	226±3.5	226±3.2	261±3.9	257±4.7	263±5.2
分解液温	159±8.6	162±3.2	161±5.5	180±6.1	181±4.5	180±5.5	203±3.3	208±5.8	208±5.1

注1) 砂温及び分解液温は5分ごとの測定値の平均値と標準偏差.

び260°Cになるように温度設定レバーを調節した. 各温度区のサンドバス上に第1段階の分解が終了したトルビーカーを置き, 時計皿で覆って30分, 60分, 90分の加熱を行った. 各温度区における各時間の分解は, 3反復で行った.

魚粉試料とは別に認証標準物質アルセノベタイン水溶液 (NMIJ CRM7901-a) を供試し, アルセノベタインとして10µg前後を300mL容トルビーカーに計りとり, 上記と同様の第1段階の分解を行った後, 200°C, 230°C及び260°Cの温度で90分の第2段階の分解を3反復で行った.

分解操作における砂温を把握するため, 第1段階及び第2段階において各試験区のすべてのピーカー直下の砂の表面温度を5分置きに赤外線放射温度計 (A&D製 AD-5611A) で測定した. また, 第1段階及び第2段階の各試験区の1つのピーカーについて分解液温をガラス製水銀温度計で5分置きに測定した.

試験2. 各種肥料・飼料等の総ヒ素分析における分解温度の影響

試験1で用いた魚粉に加え, 肥料用魚粕, 有機配合肥料 (魚粕26%配合), 汚泥発酵肥料, 加工家きん糞肥料及び乾燥ヒジキを試料として, 第2段階の分解温度をガスバーナーサンドバスによる300°C以上とする区 (以下, 高温分解区) と家庭用ホットプレートによる設定温度約200°Cとする区 (以下, 低温分解区) の総ヒ素定量値を比較した.

各試料とも2gを300mL容トルビーカーに計りとり, 試験1と同様の第1段階の分解を行った後, 高温分解区及び低温分解区ともにトルビーカーを時計皿で覆った状態で約1時間の加熱を行った. 各試験区において, 各試料を3反復で分解した. 試験1と同様に砂温を測定した.

総ヒ素定量法

試験1及び試験2において第2段階の分解が終了した試料に, 純水 (Millipore製 Elixで製造) 約20mL及び1M塩酸 (塩酸に10倍容の純水を加えて作成) 約5mLを加えて沸騰するまで加熱後, 全量フラスコに移して純水で100mLに希釈後ろ過 (東洋濾紙製濾紙 No.5B使用) した. ろ液25mLを50mL容の全量フラスコにとり, 塩酸5mL及び20%よう化カリウム溶液5mLを加えて約15分間放置

した後, 標線まで純水を加えて測定溶液とした. この測定溶液を6M塩酸, 1%テトラヒドロほう酸ナトリウム溶液 (0.5%水酸化ナトリウムに溶解した液) とともに窒素ガスで水素化物発生装置 (Jarrell Ash製 HYD-10) に導入した. 発生した水素化ヒ素を加熱吸収セルに導いて, 波長193.7nmに設定した原子吸光度計 (Jarrell Ash製 AA-781) でヒ素濃度を測定した. いずれの試薬も特級を使用した.

III 結 果

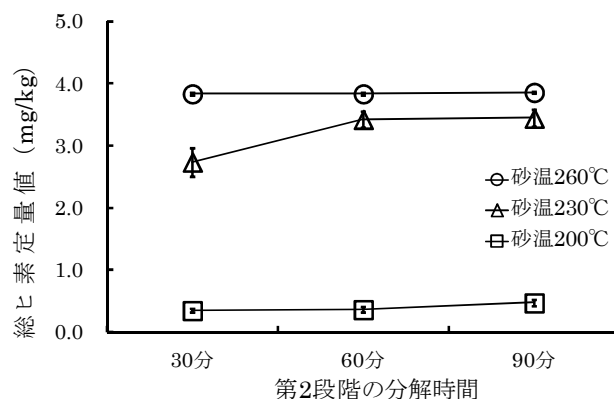
試験1. 魚粉の総ヒ素分析における分解温度及び分解時間の影響

第1段階のピーカー下の砂温及び分解液温の測定結果を第1表に示した. 分解開始～1時間後までの砂温の平均値は157°C, 分解1～2時間後までが174°C, 分解2～3時間後が172°Cであった. 同様に, 分解液温の平均値は, それぞれ114°C, 124°C, 129°Cであった.

第2段階の砂温及び分解液温の測定結果を第2表に示した. 砂温の平均値は, 200°C区では30分加熱が196°C, 60分加熱が199°C, 90分加熱が199°Cであった. 同様に230°C区では, 227°C, 226°C及び226°C, 260°C区では261°C, 257°C及び263°Cで, 試験区として設定した温度とほぼ同じ値であった. いずれの温度区及び分解時間においても5分置きに測定した温度の標準偏差は3°C～6°Cの範囲であった.

分解液温の平均値は, 分解時間による差はなく200°C区で約160°C, 230°C区で約180°C, 260°C区で約208°Cであった. 5分置きに測定した温度の標準偏差は3°C～9°Cであった.

第2段階の分解で設定した各温度区の総ヒ素定量値の分解時間に伴う推移を第1図に示した. 総ヒ素定量値の平均値は, 260°C区では30分, 60分, 90分で3.84～3.86mg/kgの範囲にあり, 3反復の標準誤差は0.02mg/kg以下と小さかった. 230°C区では30分が2.74mg/kg, 60分が3.43mg/kg, 90分が3.45mg/kgとなり, 260°C区に



第1図 第2段階の分解温度と分解時間に伴う総ヒ素定量値の推移

注) 図中の縦線は標準誤差を表す (n=3) .

比べて70%~90%の定量値であった。また、いずれの分解時間においても260°C区に比べて反復間のばらつきが大きく、特に30分の標準誤差は0.23mg/kgと大きかった。200°C区では30分が0.35mg/kg、60分が0.37mg/kg、90分が0.48mg/kgと260°C区の約10%の定量値となった。200°C区の各分解時間の標準誤差は0.04mg/kg前後と小さかった。

標準物質であるアルセノベタイン水溶液の分析結果を第3表に示した。第2段階が200°Cでは認証値の約15%、230°Cでは約62%であったのに対し、260°Cでは97%で認証値との有意差(k=2)は認められなかった。

試験2. 各種肥料・飼料等の総ヒ素分析における分解温度の影響

高温分解区と低温分解区の第2段階の砂温の平均値は、それぞれ314°C(5分置きに測定した温度の標準偏差12.9°C)、187°C(標準偏差8.4°C)であった。

各試料の総ヒ素定量値を第4表に示した。魚粉、魚粕の

総ヒ素定量値は、高温分解区がそれぞれ3.86mg/kg、4.70mg/kgであったのに対し、低温分解区はそれぞれ0.44mg/kg、0.43mg/kgと10%程度の値であった。魚粕が26%配合されている有機配合肥料及び加工家きん糞では、高温分解区がそれぞれ0.93mg/kg及び0.52mg/kg、低温分解区がそれぞれ0.52mg/kg及び0.26mg/kgで、低温分解区は高温分解区の約50%の値となった。

一方、乾燥ヒジキでは、高温分解区が129mg/kgであったのに対して、低温分解区は112mg/kgで高温分解区の90%であった。さらに、汚泥発酵肥料では、高温分解区が3.77mg/kg、低温分解区が3.58mg/kgであり、これらの値には統計的な有意差は認められなかった(p<0.01)。

IV 考 察

肥料・飼料の総ヒ素分析においては、水素化物発生原子吸光法の場合、湿式分解時の酸の種類と量、分解時間、温

第3表 第2段階分解温度と認証標準物質アルセノベタインの総ヒ素定量値

試験区	定量値 (mg/kg)	定量値標準誤差 (mg/kg)	認証値に対する割合 (%)
200°C区	3.56	2.89	14.6
230°C区	15.15	5.32	62.1
260°C区	23.78	0.34	97.4

注1) 表中の数値は3反復の平均値及び標準誤差。
 2) 分解時間は90分。
 3) 標準物質の認証値は24.4mg/kg(拡張不確かさ0.62mg/kg)。

第4表 各種肥料・飼料及び乾燥ヒジキの高温分解と低温分解における総ヒ素定量値 (mg/kg)

	魚粉(飼料)	魚粕(肥料)	有機配合肥料	汚泥発酵肥料	加工家きん糞	乾燥ヒジキ
高温分解区	3.86	4.70	0.93	3.77	0.52	129
低温分解区	0.44	0.43	0.52	3.58	0.26	112
t検定	**	**	**	0.192	**	**

注1) 第2段階の分解における砂温は高温分解区が300°C~320°C、低温分解区が180°C~200°C。
 2) 定量値は3反復の平均値。
 3) t検定の**は1%水準で有意差あり、数値はp値を表す。

度の要因が定量値に影響することが指摘されている(吉永・石黒, 2004; 浅尾ら, 2008)。また, 魚肉等海産生物に含まれているヒ素は, 有機態ヒ素の一種であるアルセノベタインが主体と言われている(宮下・貝瀬, 2010)。アルセノベタインは難分解性であり, 湿式分解でホットプレートの設定温度を320°C以上としなければ完全に無機化せず, 水素化物発生原子吸光法では十分な定量値が得られないことが報告されている(Narukawa et al., 2005)。さらに井上ら(2011)は, 認証標準物質の魚肉粉末の湿式分解において, ホットプレートの設定温度を400°C以上とすることが必要であると報告している。

著者らは, ガスパナーサンドバスを用いて砂温を270°C以上で分解を行った場合, 魚粉の総ヒ素分析値が安定的に高い値となることを経験的に認識していた。本研究では高い値が得られる分解温度の閾値を明らかにすることを目的とした。分解第2段階のサンドバスの砂温が200°Cでは分解時間を90分としても極めて低い定量値であり, 魚粉中のアルセノベタインがほとんど無機化していないと考えられた。230°Cでは分解時間60分及び90分で260°Cの約90%の定量値が得られたが, 反復誤差は大きく, 無機化には不十分な温度であった。260°Cではいずれの分解時間でも定量値は等しくなり, 反復誤差も小さかった。アルセノベタイン標準物質でも, 260°C, 90分の定量値は付与された認証値と有意差がなかった。これらのことから, 魚粉の分析においては, 砂温260°Cで分解を行った時の定量値が総ヒ素含量を表すと考えられた。

なお, 本研究ではビーカー内の分解液温も測定した。分解液温はビーカー下の砂温に比べていずれの設定温度においても約50°C低い値で推移した。分解液温はビーカー底面を通じて吸収される熱量と気化やビーカー側面からの放熱により排出される熱量の収支によって決定されるため, サンドバスの砂温とは必ずしも一致しない。湿式分解における温度条件を検討する場合は, ホットプレートの設定温度や砂温ではなく, 分解液温で比較するべきである。アルセノベタインの無機化には, 分解液温が180°Cでは不十分であり, 210°Cが必要であることが明らかとなった。また, 210°Cで分解を行った場合, 分解時間が30分でも90分と同様の定量値が得られた。このことから, 魚粉中のアルセノベタインの無機化は, 分解液温210°Cで比較的短時間に進むことが推察された。

魚由来の物質が含まれていない汚泥発酵肥料では砂温が300°C以上の高温分解区と200°C低温分解区で総ヒ素定量値に有意差は認められなかった。乾燥ヒジキにおいては, 低温分解区の値が高温分解区の約90%であった。英国のFood Standards Agencyの調査(2004)によるヒジキの総ヒ素中の無機態ヒ素含量は70%~90%と報告されており,

今回の実験におけるヒジキ低温分解区の定量値は, ほぼ無機態ヒ素含量であると考えられた。また, 安井・堤(1977)は, 食品を対象としたヒ素分析において, 湿式分解の温度を170°C~220°Cと300°C~380°Cの比較を行っており, 玄米では, 分解温度の違いによる定量値の差は認められないことを報告している。これらのように, 無機態ヒ素を多く含む試料では, 200°C前後の分解によるヒ素分析値は, 総ヒ素含量と近い値となる。しかし, アルセノベタインのような難分解性の有機態ヒ素を含む肥料・飼料の総ヒ素分析においては, 湿式分解の分解液温を210°C以上にしなければならないことが判明した。

なお, WHOによる環境保健クライテリア(2001)には, マウス急性毒性のLD₅₀が亜ヒ酸ナトリウムは42mg/kgのであるのに対し, アルセノベタインは10,000mg/kg以上と記されており, 毒性は極めて低いとされている。したがって安全性の観点から行われるヒ素分析においては, 形態別定量の必要性が指摘されている(成川ら, 2009)。しかし, 分解操作中にアルセノベタインやその他の有機態ヒ素がテトラメチルアルソニウムイオンやトリメチルアルシンオキサイドなど別の形態の有機態ヒ素に変化することが知られている(Elteren and Slejkovec 1997; Narukawa et al., 2005)。このように, 試料中のヒ素を形態別に定量することについては, 技術的な困難性が伴う。本研究では総ヒ素分析について分解温度の影響を明らかにしたが, 肥料及び飼料においても形態別ヒ素の分析は, 今後の確立すべき残された問題である。

V 摘 要

肥料・飼料の総ヒ素分析において, 湿式分解の温度条件が定量値に及ぼす影響について調べたところ, 以下の知見が得られた。

1. 魚粉を硝酸, 過塩素酸, 硫酸を用いて湿式分解した場合, 総ヒ素定量値はサンドバスの砂温が260°Cの分解に比べて, 200°Cでは約10%, 230°Cでは70%~90%となった。
2. 有機態ヒ素アルセノベタインの認証標準物質の総ヒ素定量値は, 砂温260°Cの分解で認証値と有意差のない値が得られた。このことから, 魚粉に含まれているアルセノベタインは, 260°Cの分解でほぼすべて無機化したと考えられた。このときの分解液温は約210°Cであった。
3. 魚粉, 配合肥料, 汚泥肥料等を砂温約200°Cの低温分解と約300°Cの高温分解を行ったところ, 魚粉を含む試料では, 低温分解の総ヒ素定量値は高温分解の50%以下であった。しかし, 汚泥発酵肥料では高温分解と低温分解の差は認められなかった。

4. 以上から、肥料・飼料の総ヒ素分析を行う場合、アルセノベタイン等の有機態ヒ素を含む試料では、湿式分解の砂温を260℃以上、分解液温を210℃以上とする必要があることが明らかとなった。

VI 引用文献

- 浅尾直紀・石田有希恵・井塚進次郎・齊木雅一 (2008) 汚泥肥料中のヒ素測定—分解方法の改良—. 肥料研究報告. 1 : 74—81.
- 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (2013) 肥料等試験法.
http://www.famic.go.jp/ffis/fert/bunseki/sub9_shiken-2013.html
- Elteren, J and Z Slejkovec (1997) Ion-exchange separation of arsenic compounds by high-performance liquid chromatography-hydride generation atomic fluorescence spectrometry and stability tests for food treatment procedures. *J. Chromatogr. A*. 789 : 339—348.
- Food Standards Agency (2004) Food Survey Information Sheet 61/04 Arsenic in seaweed.
<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/arsenic-seaweed.pdf>
- 井上 豪・吉田直史・渡口輝・玉城不二美・仲宗根一哉・城間博正 (2011) 水素化物発生法を用いる総ヒ素分析のための湿式灰化法の改良. 分析化学. 60 : 691—695.
- 宮下振一・貝瀬利一 (2010) 海産物由来ヒ素化合物の生体影響と体内動態. 食衛誌. 51 : 71—91.
- Narukawa, T., T. Kuroiwa, K. Inagaki, A. Takatsu and K. Chiba (2005) Decomposition of organoarsenic compounds for total arsenic determination in marine organisms by the hydride generation technique. *Appl. Organometal. Chem.* 19 : 239—245.
- 成川知弘・黒岩貴芳・千葉光一 (2009) 原子スペクトル分析におけるヒ素化合物の化学形態に依存する分析感度差. 分析化学. 58 : 185—195.
- 農林水産省農業環境技術研究所 (1992) 肥料分析法 (1992年版). pp.134—136. 財団法人日本肥糧検定協会. 東京.
- 農林水産省畜産局長 (2012) 飼料分析基準の制定について (飼料安全法関係通知, 2012年改正).
- 飼料分析基準研究会 (2004) 飼料分析法・解説—2004—. 社団法人日本科学飼料協会. 東京.
- 杉村 靖・浅尾直紀・井塚進次郎 (2009) 肥料中のヒ素測定—改良分解法の適用範囲拡大—. 肥料研究報告. 2 : 18—24.
- World Health Organization (2001) Acute LD₅₀ of various organoarsenicals in mice and rats. *Environmental Health Criteria* 224 Table 28 :
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm>
- 安井明美・堤 忠一 (1977) アルシン—原子吸光法による微量ヒ素定量における湿式分解法の食品試料への適用. 分析化学. 26 : 809—814.
- 吉永 晋・石黒瑛一 (2004) ヒ素定量時における分解方法の検討について. 飼料研究報告. 29 : 160—163.
- 吉永 晋・須永善行・八木寿治・石黒瑛一・種池康仁 (2006) 還元気化—超低温捕集—原子吸光度計による魚粉中のヒ素の形態別定量. 飼料研究報告. 31 : 128—135.

Influence of Wet-ashing Temperature on Total Arsenic Value Obtained by Hydride Generation Analysis of Fertilizers and Feeds

Koichi AOKI, Koichi ANDO and Takashi KUBOTA

Key words : arsenobetaine, fertilizers and feeds, fish meal, organoarsenic, total arsenic

Summary

We investigated the wet-ashing temperature necessary for complete decomposition of the organic arsenic compounds such as arsenobetaine contained in fertilizers or feeds. Complete decomposition of organic arsenic is essential for analyzing total arsenic by means of the hydride generation technique. For the sand on the hotplate, a temperature of 260 °C or higher was necessary during wet-ashing with an acid mixture of HNO₃, H₂SO₄, and HClO₄ for the analysis of total arsenic in fish meal. Under these conditions, the temperature of the acids in the beaker reached 210°C.