

B-15 重金属検出用蛍光色素を用いた 玄米中カドミウム濃度分析システムの開発

○瀧谷 明義¹・吉川 弘晃²・羽深 昭³・
鈴木 裕子⁴・岩渕 拓也⁴・高橋 正宏¹・佐藤 久^{1*}

¹北海道大学大学院工学院 (〒060-8628北海道札幌市北区北13条西8丁目)

²神鋼環境ソリューション技術開発センター (〒651-2241兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-4)

³中央大学理工学部 (〒112-8551東京都文京区春日1-13-27)

⁴メタロジェニクス株式会社 (〒260-0856千葉市中央区亥鼻1-8-15)

* E-mail: qsatoh@eng.hokudai.ac.jp

1. はじめに

重金属は様々な健康被害をもたらす環境汚染物質である。重金属の暴露経路として水、土壌、大気および食品が挙げられる。例えば、カドミウム (Cd) は環境中に普遍的に存在するため、米、野菜、果実、肉、魚など多くの食品に含まれる。中でも植物に吸収されやすく、コメを主食とする日本人にとっては全Cd摂取量の実に4割がコメの摂取に起因することが知られている¹⁾。このような背景から、近年、日常生活において誰もが摂取しうるような低濃度のCdにも関心が高まっている。コメ中Cd濃度の基準値については、国際的な食品規格を決定する委員会であるコーデックス (CODEX) において、2006年7月に「精米中濃度として0.4 mg/kg」という値が決定された²⁾。玄米のCd含有量について、日本全国の様々な地域 (約3万7千点) を調査した結果によると、日本産の玄米1 kg中に含まれるCd量は平均して0.06 mg (=0.06 ppm) であった³⁾。

現在、玄米中のCd分析の公定法では原子吸光やICP-OESおよびICP-MS法が用いられている。これらの方法は、装置および分析コストが高い、分析時間が長い、といった問題がある。従って、玄米中のCd濃度を、低コストで短時間に分析する技術を開発することは極めて重要である。本研究グループではこれまでにZn²⁺、Cd²⁺、Hg²⁺を選択的に検出する変色型蛍光色素 (BDP-TPY) を開発し、BDP-TPYを用いて、多種多様な有機物やイオンを含む路面排水中のZn濃度でさえも低コストで短時間に分析できる技術を開発した⁴⁾。従って、この蛍光分析を玄米中Cd

分析に適用できれば上記の問題を解決することができる。BDP-TPYで玄米中Cd濃度を分析する場合には、玄米中のZn濃度がCd濃度よりも2~3桁高いため、Znを除去する前処理が不可欠となる。従って、本研究では短時間かつ低コストで玄米中Cd²⁺を精製する前処理法を開発し、玄米中Cd濃度をBDP-TPYで分析することを試みた。

2. 実験方法

2.1 玄米中Cd精製法

本研究で使用使用するBDP-TPYはZn²⁺、Cd²⁺、Hg²⁺を選択的に検出する。玄米中Hg濃度は極めて低いと考え、ZnとCdを分離する方法を検討した。Kallmannらは、Zn²⁺とCd²⁺の塩化物 (Cl) イオン錯体 (陰イオン) の安定度定数が異なることを利用して、陰イオン交換樹脂を用いてZnとCdを分離する方法を報告している⁵⁾。この方法を参考に、以下の方法でZnとCdを分離することを試みた。まず、陰イオン交換樹脂 (1×8 200-400, DOWEX) を、純水、エタノール、超音波洗浄で処理した。この樹脂をカラム (Disposable Polypropylene Column, 1-5 mL, Thermo) に0.5mL充填した。さらに、カラムに純水を2 mL、0.1N HClを5 mL通液した。Cl濃度を調整したCd・Zn混合液をこのカラムに通すと、Cdはカラムに保持され、Znはカラムから排出される。

2.2 実験方法

玄米 20 g を Labo Milser LM-PLUS (OSAKA CHEMICAL) を用いて30秒間粉碎した。80 mLの0.1

M HClに粉碎した玄米を添加し、10分間または1時間間攪拌した。このHCl濃度は本研究を開始する前に検討して最適化した濃度である。この上澄みを15,000 rpmで10分間遠心分離した。さらに上澄水をメンブレンフィルター（1.0 μm , ADVANTEC）で吸引ろ過した。このろ液20 mLを上述のカラムに通水し、0.1M HClを40 mL通しカラム内を洗浄した。つづいてMilli-Q水を30 mL通しカラム内に保持されたイオンを溶出させた。カラムから流出したサンプルろ液を流出液、0.1M HClを洗浄液、Milli-Q水を溶出液、と称する。これらの溶液の金属濃度をICP-OES（島津製作所; ICPE-9000）を用いて分析した。

10 mLメスフラスコに、BDP-TPYアセトニトリル溶液5 mL（最終濃度1 μM ）、溶出液4.5 mL、80 mM緩衝液（Tris, pH=10.2）0.5 mLを順に添加し混合した。この混合液の蛍光スペクトルを分光蛍光光度計（日本分光, V-630）を用いて分析した。励起波長は525 nmとした。あらかじめ作成しておいた検量線を用いて玄米中Cd濃度を定量した⁴⁾。この結果をICP-OESで分析した結果と比較した。

玄米中の金属濃度は以下の方法により定量した。玄米をマイクロ波試料前処理装置（マイルストーンゼネラル, ETHOS ONE）を用いて分解した。分解は標準アプリケーションB 0114玄米に従って行った。その後、ICP-OESを用いて玄米中のCd濃度を測定した。認証標準物質 玄米粉 NMIJ CRM 7531-a（産業技術総合研究所）を用いてプロトコルの精度を確認した。

3. 結果と考察

(1) 玄米からのCdの抽出

0.1 M HClによる玄米からのCd抽出効率を検討するため、抽出液中Cd濃度と公定法により求めた玄米中Cd濃度を求め、抽出率を算出した。玄米（Cd濃度0.28 mg/kg, および0.07 mg/kg）を10分処理した場合にはCd抽出率は97%および93%, 認証標準物質（Cd濃度0.29 mg/kg）を10分処理した場合にはCd抽出率は80%であった。玄米および認証標準物質（Cd濃度0.07 mg/kg, および0.29 mg/kg）を60分処理した場合にはCd抽出率は92%および81%であった。処理時間10分でも抽出効率が低下しなかったことから、HCl処理時間を10分とすることとした。認証標準物質において抽出率が低かった理由として、Cd濃度が高かったこと、0.1 M HClでは玄米中の抽出しやすいCdのみが抽出され、HClでは抽出できないCd（キレートおよび有機態Cdなど）は抽出されなかったことが考えられる。

(2) カラムによるCdの精製

Cd, Zn, Cu, Feの流出液、洗浄液、溶出液中の存在割合を図1に示す。玄米抽出液中のCd濃度は0.043 mg/L（量は0.86 μg ）であった。流出液および洗浄液中にはCdは検出されず、溶出液中のCd量 \pm 標準偏差は0.90 \pm 0.04 μg （n=6）であり、回収率は105 \pm 4%であった。玄米抽出液中のZn, Cu, Fe量はそれぞれ83, 9.0, 24 μg であり、そのほとんどが流出液とともにカラムから排出された。回収液中のZn, Cu, Fe量はそれぞれ検出限界以下、0.01 μg , 検出限界以下であった。この結果から、本精製法で玄米抽出液中のCdを極めて高純度に精製できることが明らかになった。

(3) 蛍光分光法の検量線

図2にCd²⁺濃度の変化に応じたBDP-TPYの蛍光スペクトルの変化を示した。BDP-TPYは541 nmに蛍光極大波長を示した。Cd²⁺濃度の増加に伴い、蛍光色素由来の541 nmの蛍光強度が減少し、新たにCd-BDP-TPY錯体由来の562 nmの蛍光強度が増大した。この2波長の蛍光強度比（F₅₆₂/F₅₄₁）を算出し、横軸にCd²⁺濃度、縦軸に蛍光強度比をプロットすることで検量線を作成した（図3）。このCd²⁺濃度の範囲ではプロットは直線的に増加したので、データを一次関数で近似した。決定係数（R²）は0.9967と高かった。ブランクサンプルの蛍光スペクトルを11回測定し、その標準偏差の3倍および10倍の値から検出限界および定量限界をそれぞれ算出した。検出限界値は6 $\mu\text{g/L}$ （コメ中Cd濃度としては0.04mg/kg）、定量下限値は21 $\mu\text{g/L}$ （コメ中Cd濃度としては0.13mg/kg）であった。

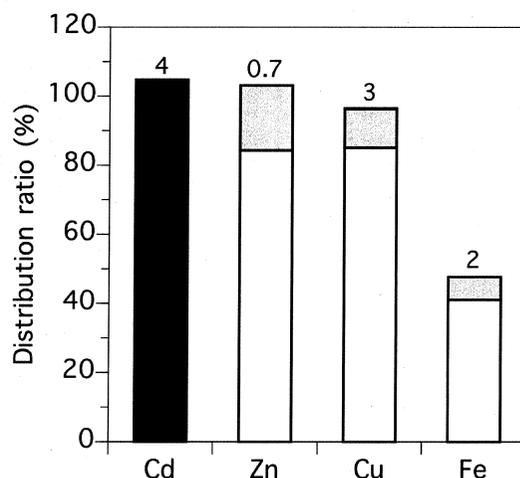


図1 Cd, Zn, Cu, Feの流出液（白色）、洗浄液（灰色）、溶出液（黒）中の存在割合

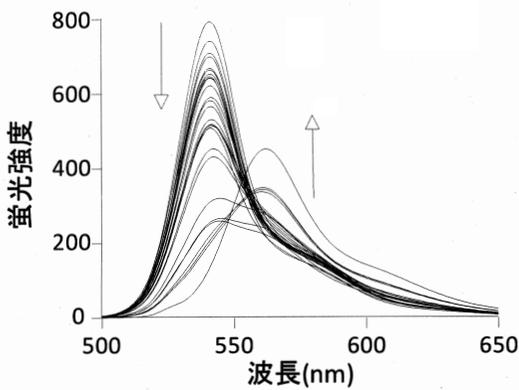


図2 Cd²⁺濃度の変化に応じた蛍光スペクトルの変化

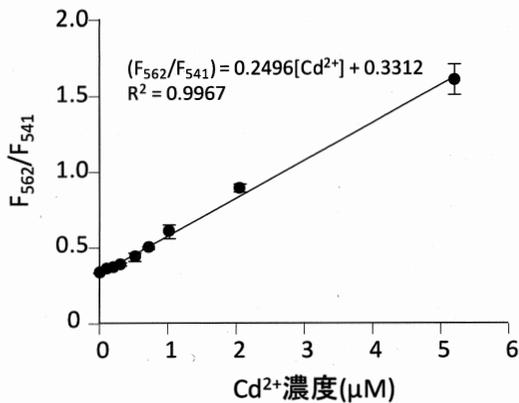


図3 BDP-TPYのCd²⁺に対する検量線

(4) 蛍光分光法を用いた玄米中Cd²⁺濃度の定量

BDP-TPYを溶出液と混合し、蛍光スペクトルを測定し、上記の検量線から玄米中Cd濃度を算出した。これらの値と公定法により求めた玄米中Cd濃度を比較した(図4)。ICP-OESと蛍光分光法により算出したCd濃度は同程度であり、ほとんどのデータは図4中の傾き1の直線近傍に分布した。定量下限値(0.13mg/kg)以下のサンプルも分析できた。最も低濃度のサンプル(0.068 mg/kg)は分析玄米量および抽出液量を2倍に変更し測定したものである。このデータに対応する定量下限値は半分の0.07 mg/kgとなる。この値は日本の玄米中Cd濃度の平均値である。このように、分析玄米量および抽出液量の比率を高めると、カラムによりCdが濃縮されるので、本法の定量下限値は低下する。例えば、溶出液量(30 mL)を変えずに流出液量を5倍(100 mL)にすればコメ中Cd濃度に換算される定量限界は0.03 mg/kgとなる。玄米抽出液にCd²⁺を添加したデータもICP-OESとデータと同程度となった。このことから、本

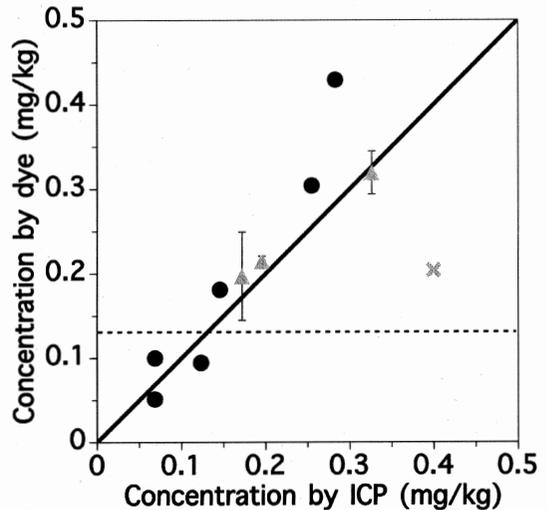


図4 ICP-OES(横軸)と蛍光分光法に(縦軸)より算出したCd濃度の関係。●は玄米、▲は玄米抽出液にCdを添加したサンプル、×は認証標準物質。破線は蛍光分光法の定量下限値を示す。

研究で開発したCd精製カラムは効率よくCdを精製できること、HClを用いることでCdが低濃度であれば玄米からCdを十分に抽出できること、が明らかとなった。Cd濃度が高い領域で蛍光分光法の測定誤差が大きくなった原因は不明である。

4. 結論

本研究では、玄米から各種金属を簡便に抽出する方法、多種多様な金属を含む抽出液からCd²⁺を選択的に分離する手法、さらには蛍光分光法により玄米中のCd濃度を定量する方法を開発した。今後は蛍光色素を基板に固定することで光化学センサーを開発する。これにより分析玄米量を削減し、多検体一斉分析システムを構築する。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、平成25年度ものづくり中小企業連携支援事業(戦略的基盤技術高度化支援事業)の支援を受けました。ここに記し謝意を表します。

参考文献

- 1) 厚生労働省Website:<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2003/12/h1209-1c.html>
- 2) 中西 準子ほか, 詳細リスク評価書シリーズ13 カドミウム, 丸善株式会社, 2008, p19
- 3) 食糧庁, 全国実態調査結果, 1997-1998
- 4) Hafuka *et al.*, 2014. *Water Res.*, **54**, 12-20.
- 5) Kallmann *et al.*, 1956. *Anal. Chem.*, **28** (2), 230-233.