技術論文

日本食品標準成分表における魚類中ヨウ素の新規分析法

三宅大輔^{1*}, 坊垣暁代¹, 徳田千晴¹, 五十嵐友二¹, 安井明美²

¹ 一般財団法人日本食品分析センター

² 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門

A New Analytical Method for Measuring Total Iodine Content in Fish for the Standard Tables of Food Composition in Japan

Daisuke Miyake^{1*}, Akiyo Bogaki¹, Chiharu Tokuda¹, Tomoji Igarashi¹ and Akemi Yasui²

¹ Japan Food Research Laboratories, 3-1 Toyotsu-cho, Suita, Osaka 564-0051

² Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

The standard method prescribed in the Analytical Manual of the Standard Tables of Food Composition in Japan for measuring total iodine is not always applicable to fish, particularly when they contain large amounts of lipophilic iodine compounds. In this study, we developed a new analytical method with alkaline-ashing followed by ICP-MS (AA-ICP-MS) to cover this shortcoming in the standard method. The fish samples were ashed with potassium hydroxide and iodine was subsequently extracted with water from the ash; iodine content was then determined by ICP-MS. A single-laboratory validation of the AA-ICP-MS method showed recoveries ranging from $85 \pm 9\%$ to $96 \pm 7\%$, and the difference between certified and determined values was not significant. Furthermore, both of the repeatability and intermediate precision in the RSD are 7.7%, with a quantification limit of 0.20 mg/kg. Based on these results, we suggest that this AA-ICP-MS method represents a superior supplementary method for the Analytical Manual to determine 0.20 mg/kg and more of total iodine specifically in fish.

(Received Nov. 4, 2016; Accepted Jan. 30, 2017)

Keywords : Standard Tables of Food Composition in Japan, Analytical Manual, fish, iodine, ICP-MS

キーワード : 日本食品標準成分表, 分析マニュアル, 魚類, ヨウ素, ICP-MS

微量の必須ミネラルであるヨウ素は海藻類, 特に昆布に高濃度で含まれる。日本では日常的に海藻が摂取されるため, 日本人のヨウ素の推定摂取量は平均で1~3mg/日と世界的にも非常に高い水準にあると推定されている¹⁾。ヨウ素は欠乏の場合も過剰の場合も甲状腺の機能異常等を引き起こすため²⁾, 世界的にはヨウ素欠乏症が懸念される中³⁾, 日本では過剰摂取に注意が必要とされる場合がある¹⁾。

日本食品標準成分表(成分表)⁴⁾は日本で唯一の食品成分に関する公的なデータベースであり, 栄養管理等の様々な場面で活用されている。近年は栄養表示が義務化され, 表示値を設定する際に利用するデータベースとしての役割も大きい。ヨウ素は主に食品を通じて摂取されるため, 食品中の微量ヨウ素を測定する技術は非常に重要である。成分表における食品の成分分析は, 成分表の分析マニュアル⁵⁾に記載の方法(マニュアル法)に従って実施される。マニュアル法は栄養成分および食品分類毎に分析法の妥当性が確認されている。しかし, 食品のマトリックスは多種多様で

あることおよびヨウ素は自然界で様々な形態で存在することから⁶⁾⁷⁾, 試料によっては分析法の適用が困難な場合が想定される。また, マニュアル法は設定された当時, 最適と思われる方法が選択されているものの, 分析技術は時代と共に進歩していることから, 必要に応じて更新されることが望まれる。

成分表中のヨウ素は最小値を0.01 mg/kgとする極めて低い濃度レベルで記載されており, 分析には高い感度が要求される。食品中のヨウ素を高感度で測定する方法としては, マニュアル法の他に中性子放射化分析法(NAA)⁸⁾⁹⁾, 誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS法)^{10)~14)}, 電子捕捉型検出器(ECD)を用いたガスクロマトグラフ(GC)法(GC-ECD法)¹⁾等がある。この中で, NAAは原子炉等の特別な施設を必要とするため汎用的といえず, 成分表の分析法としては適さない。誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)を用いた食品中の微量ヨウ素分析の前処理法として, 近年は酸条件によるマイクロ波分解法も報告されているが¹⁰⁾¹¹⁾,

¹ 〒564-0051 大阪府吹田市豊津町3-1, ² 〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

*連絡先 (Corresponding author), miyaked@jfrl.or.jp

広範な食品に適用された事例はない。Eckhoff ら¹⁰⁾ は魚類を対象に同法を適用しているが、定量に標準添加法を用いており簡便な方法とはいえない。さらに硝酸で分解した液を中和するため、試料溶液には最大で 46 g/L の不揮発性塩（硝酸アンモニウム）が含まれる。後述するとおり、成分表における ICP-MS の測定では共存する塩濃度を低減する必要がある、この場合は約 50 倍以上の希釈が必要と考えられるため、感度の面でも同法の優位性はない。また、ヨウ化物イオンやヨウ素酸イオンは酸性溶液中で不安定なため、精度のよい分析法を開発するには、前処理をアルカリ条件下とすることが望ましい。

現行の分析マニュアルでは、ヨウ素の分析法としてテトラメチルアンモニウムヒドロキシド (TMAH) 抽出—ICP-MS 法が採用されている。同法は簡便で定量限界の低い優れた方法であり、同じ原理を利用した多種食品中の微量ヨウ素の分析例も幾つか報告されている^{12)~14)}。これらの報告では抽出溶媒として 25%TMAH がそのまま又は 6 倍希釈で用いられており、また、抽出温度は 90℃である。一方、マニュアル法の抽出溶媒は 0.5% の TMAH 溶液という水性の希薄溶液であり、抽出温度も 60℃という比較的温和なものである。そのため脂質の多い試料に対してはヨウ素の抽出が不十分となることが懸念され、実際に我々は魚油について同法が適用できないことを確認した（未発表）。このことにより、マニュアル法は食用魚類に対してヨウ素の抽出が不十分なのではないかと疑われたことから、今般、文部科学省の委託事業*として、魚類中のヨウ素に対する同法の妥当性の検証調査が実施された。その結果、マニュアル法の問題点が明らかとなり、それを補うために新規の分析法（アルカリ灰化—ICP-MS 法）を開発して単一試験所バリデーションを実施し、分析マニュアルに追加する方法として提案したので、その詳細を報告する。

実験方法

1. 試料

(1) 市販の食用魚類

4 種の市販の国産魚類（カツオ、ブリ、マイワシおよびマサバ）を一尾単位で購入し、その可食部をフードプロセッサ（パナソニック製 MK-K61）および粉碎機（大阪ケミカル製 FM-1）等で均質化して試料とした。魚種毎の除去部位は次のとおりである。カツオおよびブリ：頭部、内臓、骨、ひれおよび皮、マイワシ：頭部、内臓、骨およびひれ、マサバ：頭部、内臓、骨、うろこ、ひれおよび皮。

(2) 魚油

一般財団法人日本水産油脂協会から提供された、4 種の魚油〔ペルー産アンチョビー油（2014 年製造）、カツオ主体油（2016 年 2 月 10 日製造）、サバ・イワシ・タラ・雑魚油

（2016 年 2 月 9 日製造）およびマグロ油（2016 年 2 月 10 日製造）〕を試料とした。

(3) 認証標準物質（Certified Reference Material, CRM）

European Commission, Joint Research Centre から提供されている ERM®-BB422 [Fish Muscle, ヨウ素の認証値および拡張不確かさ（乾物換算値） $1.4 \pm 0.4 \text{ mg/kg}$ ($k=2.78$)] を分析に供した。なお、認証値は 5 機関による測定値の平均値であり、測定法の概略は 1 機関が NAA, 1 機関がマイクロ波分解—ICP-MS 法, 3 機関が TMAH 抽出—ICP-MS 法である。

2. 試薬および標準溶液

(1) 試薬

エタノール（99.5, キンダ化学製、試薬特級）、ヘキサン（和光純薬工業製、残留農薬・PCB 試験用）および 2-ブタノン（Sigma-Aldrich 製、試薬特級）は精製せずにそのまま用いた。水は水道水を純水製造装置（日本ミリポア製 Elix Advantage 10）で精製して用いた。

200 mg/L 亜硝酸ナトリウム溶液：亜硝酸ナトリウム（Sigma-Aldrich 製、試薬特級）0.02 g を水に溶解し、100 mL とした。カリウム塩溶液：4 mol/L 水酸化カリウム溶液 4 mL および 250 g/L 硝酸カリウム溶液 2 mL をとり、水で 100 mL とした。250 g/L 硝酸カリウム溶液：硝酸カリウム（Sigma-Aldrich 製、試薬特級）250 g を水に溶かし、1000 mL とした。4 mol/L 水酸化カリウム溶液：水酸化カリウム（Sigma-Aldrich 製、試薬特級）224 g を水に溶かし、1000 mL とした。0.5%TMAH 溶液：25%TMAH（多摩化学工業製、超高純度分析用試薬）を水で 50 倍希釈した。硫酸（1+1）：水 250 mL に硫酸（和光純薬工業製、精密分析用）250 mL を加え、混和した。

内標準溶液：テルル標準液（関東化学製、原子吸光分析用、1000 mg/L）0.5 mL をとり、水で 250 mL とした（テルル濃度 2 mg/L）。

(2) 標準溶液

標準溶液は採用した手法ごとに以下の手順で調製した。

マニュアル法の場合：Anion Standard 1000 mg/L Iodine（SPEX 製）を水で 1 mg/L に希釈した。この液 5~500 μL をとり、それぞれに 25%TMAH 1 mL を加えた後、水で 50 mL とした（濃度範囲 0.1~10 $\mu\text{g/L}$ ）。また、25%TMAH 1 mL を水で 50 mL とし、濃度 0 の標準溶液とした。

アルカリ灰化—ICP-MS 法の場合：マニュアル法と同様に操作し、水で 50 mL とする前にカリウム塩溶液 1 mL を加えた（濃度範囲 0.1~10 $\mu\text{g/L}$ ）。また、25%TMAH 1 mL にカリウム塩溶液 1 mL を加え、水で 50 mL としたものを濃度 0 の標準溶液とした。

GC 法の場合：Anion Standard 1000 mg/L Iodine（SPEX 製）を水で 0.1 mg/L に希釈した。

3. 装置

ICP-MS は Agilent 7500cx, GC は Agilent 6890N（いず

* 文部科学省、日本食品標準成分表における分析方法の妥当性検証調査（2015）

れも Agilent Technologies 製) を使用した。ICP-MS および GC の操作条件は次のとおりとした。

<ICP-MS 操作条件> 導入速度: 1.0 mL/min, RF パワー: 1.5 kW, プラズマガス (流量): アルゴン (15 L/min), キャリアガス (流量): アルゴン (0.90 L/min), メイクアップガス (流量): アルゴン (0.25 L/min), ネブライザ: Micro mist ネブライザ, 測定質量数 (m/z): 127 (ヨウ素) および 128 (テルル), ガスモード: ノンガスモード

<GC 操作条件> カラム: DB-WAX (J&W 製) ϕ 0.25 mm $\times$ 30 m (膜厚 0.25 μ m), カラム温度: 45°C (2 min 保持) $\rightarrow$ 10°C/min 昇温 $\rightarrow$ 150°C (5 min 保持), 注入方法: スプリットレス (サンプリング時間: 1 min), 注入口温度: 200°C, 検出器: ECD, 検出器温度: 250°C, キャリアガス (流量): ヘリウム (1.3 mL/min), メイクアップガス (流量): 窒素 (30 mL/min)

4. 分析方法

(1) 試料中のヨウ素の分析

試料中のヨウ素は以下の3方法で定量し、結果を比較検討した。

(i) マニュアル法

日本食品標準成分表 2015 年版 (第七版) 分析マニュアル⁵⁾に記載のヨウ素の分析法に従った。即ち、試料 0.5~1 g をポリプロピレン製容器にとり、0.5% TMAH 溶液 50 mL を加えて混和し、60°C で1夜放置した。放冷後、1970 $\times$ g で10分間遠心分離し、得られた抽出液を試料溶液とした。試料溶液 10 mL をとり、内標準溶液 100 μ L を加えて ICP-MS で測定した。標準溶液について試料溶液と同様に操作して作成した検量線から、内標準法により試料溶液中のヨウ素濃度を求め、試料中のヨウ素濃度を算出した。本法の定量限界は 0.01 mg/kg である。

(ii) GC 法

食品表示基準に係る通知 (消食表 139 号)¹⁾ および桑平らの方法¹⁵⁾を参考に分析した。即ち、試料 1~5 g をニッケルるつぼにとり、4 mol/L 水酸化カリウム溶液 4 mL, 250 g/L 硝酸カリウム溶液 2 mL およびエタノール 5 mL を加え混合した。100°C のホットプレート上で1時間加熱後、150°C のホットプレート上で水分を留去した。ホットプレート上で徐々に温度を上げて緩やかに予備灰化した後、500°C の電気炉中で約3時間灰化した。放冷後、灰に水約 30 mL を加えて時計皿で覆い、30分間 100°C のホットプレート上で加熱した後、ろ紙 (アドバンテック東洋製, No. 5B) でろ過した。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙およびるつぼを十分に洗浄した後、水で 100 mL とし、試料溶液とした (試料の秤取からここまでの操作を以降、「アルカリ灰化」という)。試料溶液 1~10 mL をとり、水で 10 mL とした後、硫酸 (1+1) 1 mL, 2-ブタノン 1 mL および 200 mg/L 亜硝酸ナトリウム溶液 1 mL を加え混和した。60分間放置した後、ヘキサシ 10 mL を正確に加えて30秒間振

とうし、ヘキサシ 1 μ L を GC-ECD に注入した。水 10 mL および標準溶液 1~5 mL を水で 10 mL としたものについて試料溶液と同様に操作して作成した検量線から、絶対検量線法 (ピーク高さ法) により、試料溶液中のヨウ素濃度を求め、試料中のヨウ素濃度を算出した。なお、消食表 139 号ではバックドカラムによる測定法が示されているが、本検討では、より一般的で分離能の高いキャピラリカラムを用いた。

(iii) アルカリ灰化—ICP-MS 法

試料 1~5 g を (ii) に従い、アルカリ灰化した。得られた液 1 mL をとり、25% TMAH 1 mL を加えて水で 50 mL とし、試料溶液とした。試料溶液 10 mL をとり、内標準溶液 100 μ L を加え、ICP-MS で測定した。標準溶液について試料溶液と同様に操作して作成した検量線から、内標準法により試料溶液中のヨウ素濃度を求め、試料中のヨウ素濃度を算出した。

(2) 水溶性および脂溶性ヨウ素化合物の分離定量

水溶性および脂溶性ヨウ素化合物の分離定量は以下の方法によった。

試料 3~6 g をポリプロピレン製容器にとり、0.5% TMAH 溶液 50 mL を加えて混和し、60°C で1夜放置した。放冷後、1970 $\times$ g で10分間遠心分離した。得られた抽出液について、以下、(1) の (i) マニュアル法と同様にヨウ素を分析し、これを水溶性ヨウ素化合物とした。水溶性ヨウ素化合物の定量方法は試料採取量が異なる以外はマニュアル法と同じである。一方、抽出液の上に浮いていた油およびエマルジョンは全量を採取して (1) の (iii) アルカリ灰化—ICP-MS 法でヨウ素を分析し、これを脂溶性ヨウ素化合物とした。水溶性および脂溶性ヨウ素化合物はいずれも試料中のヨウ素濃度として定量した。

実験結果および考察

1. 測定法および前処理法の選択

測定法は高感度で汎用性があり、また、従来よりマニュアル法および消食表 139 号で採用されている ICP-MS 法および GC-ECD 法を検討することとした。一方、TMAH 抽出法以外のアルカリ条件による前処理法としては、消食表 139 号や桑平らの報告で用いられているアルカリ灰化法があり、これらは多種の食品で実績がある。そこで、新規に提案する前処理法として、アルカリ灰化法を検討することとした。なお、添加するアルカリの種類として、消食表 139 号では水酸化ナトリウム、桑平らの報告では水酸化カリウムが用いられているが、水酸化カリウムの方が融点が高く、また、イオン半径の違いによりアルカリとしての強度が優る。したがって本研究では、より強い反応条件で結合を切り、試料からヨウ素を引き抜いて確実に灰中に固定できると考えられる水酸化カリウムを用いることとした。試薬の添加量はマトリックスの違いに対応するため、桑平

らが検討した最大量とした。また、魚類は脂質を多く含む場合があるため、試薬が試料によくなじむよう、消食表 139 号に従いエタノールを添加することとした。

2. アルカリ灰化—ICP-MS 法における試料溶液の希釈率

アルカリ灰化—ICP-MS 法では、試料中のヨウ素をアルカリで固定すると同時に灰化を促進するため、試料に水酸化カリウムおよび硝酸カリウムを添加して加熱する。このとき、操作中のロスがないと仮定した場合、100 mL に一次定容した溶液中のカリウム濃度は 8170 mg/L となる。ICP-MS による測定では一般に、装置への負荷を軽減するため、試料溶液中の共存塩濃度を 1000 mg/L 以下にすることが推奨される。したがって、この液を ICP-MS で測定するには約 10 倍以上に希釈する必要がある。更に成分表の分析では多数の試料を測定するため、装置への負荷を可能な限り低減する必要があった。一方、ICP-MS による通常の測定では、試料に由来する共存塩により $\pm 20\%$ 程度の内標準の感度変化が観測されることが経験的に知られている。そこで、カリウムを含まない標準溶液の内標準（テルル）の平均イオンカウント数（ S ）に対し、試料溶液のテルルの平均イオンカウント数（ T ）を測定し、その比（ T/S ）が 0.8~1.2 であることを指標に装置への負荷を評価して許容できる希釈率を検討した。その結果、25 倍の希釈では $T/S=0.79$ となったのに対し、50 倍の希釈では $T/S=0.87$ の値が得られた（いずれも 3 測定の平均値）。以上により、100 mL に定容後の希釈率は 50 倍に設定した。

3. マトリックスマッチング

試料溶液は 50 倍に希釈するものの、ヨウ素および内標準に比べて高濃度のカリウムが測定値に影響する可能性がある。そこで、試料溶液を 50 倍希釈した場合に相当する濃度のカリウム塩（水酸化カリウムおよび硝酸カリウム）を標準溶液に添加した場合の測定値（ A ）について、添加しない場合の測定値（ N ）に対する比（いずれも内標準法で求めた濃度の比）を求めたところ、0.2~10 $\mu\text{g/L}$ で $A/N=1.10\sim 1.11$ と、広範囲ではほぼ一定の変化（約 10% の増感）を示した（Table 1）。そこで、アルカリ灰化—ICP-MS 法においては、標準溶液にカリウム塩溶液（2. 試薬および標準溶液参照）を添加し、いわゆるマトリックスマッチングの手法により、測定値の変化を抑制することにした。

4. 3 方法による分析値の比較

中間条件（同一のオペレーターが同一の装置を用い異なる日に結果を得る繰り返し測定の条件。以下同じ。）でマニュアル法、GC 法およびアルカリ灰化—ICP-MS 法により、市販の食用魚類を分析した。また、魚油そのものについても前述の未発表データを検証するため、同様に分析した（Table 2）。いずれの試料についても、マニュアル法が最低の値、GC 法が最高の値を示し、マニュアル法の分析値に対する GC 法の分析値の比は市販の食用魚類について

Table 1 Observed concentration whether the standard solutions were added with potassium salt or not

Concentration ($\mu\text{g/L}$)	Measured value ($\mu\text{g/L}$)		
	a) Added with potassium salt*	b) Not added with potassium salt*	Ratio (a/b)
10	11.00 $\pm$ 0.04	9.89 $\pm$ 0.09	1.11
2	2.22 $\pm$ 0.03	2.01 $\pm$ 0.02	1.10
0.2	0.236 $\pm$ 0.002	0.212 $\pm$ 0.003	1.11

* A mean value $\pm$ standard deviation of 6 measurements is shown.

Table 2 Total iodine concentration determined by each method

Samples	Measured value (mg/kg)		
	Standard method	Alkaline ashing -GC	Alkaline ashing -ICP-MS
Amberjack	0.21 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.03	0.22 $\pm$ 0.01
Skipjack tuna	0.20 $\pm$ 0.02	0.44 $\pm$ 0.05	0.30 $\pm$ 0.01
Chub mackerel	0.42 $\pm$ 0.04	0.84 $\pm$ 0.10	0.66 $\pm$ 0.01
Sardine	0.23 $\pm$ 0.06	0.72 $\pm$ 0.01	0.55 $\pm$ 0.03
Anchovy oil	0.13 $\pm$ 0.05	0.65 $\pm$ 0.16	0.57 $\pm$ 0.10
Skipjack tuna oil	0.53 $\pm$ 0.16	6.6 $\pm$ 0.9	5.9 $\pm$ 0.2
Mixed fish oil	0.53 $\pm$ 0.06	6.9 $\pm$ 0.9	6.0 $\pm$ 0.2
Tuna oil	0.14 $\pm$ 0.04	3.9 $\pm$ 0.3	3.5 $\pm$ 0.1

A mean value $\pm$ standard deviation of triplicate (for fishes) or duplicate (for fish oils) measurements is shown.

は 1.7 (ブリ)~3.1 (マイワシ)、魚油については 5.1 (アンチョビー油)~27.7 (マグロ油) となり、ブリのマニュアル法とアルカリ灰化—ICP-MS の測定値の組を除き、3 方法の分析値は一致しなかった。

市販の食用魚類よりも魚油の方が 3 方法の分析値の乖離が大きかったことから、脂質中にマニュアル法では測定できない形態のヨウ素化合物が存在することが示唆された。そこで市販の食用魚類について、次に示したように水溶性および脂溶性ヨウ素化合物の分離定量を試みた。

5. 水溶性および脂溶性ヨウ素化合物の分離定量

マニュアル法では試料を TMAH 溶液で抽出した後に遠心分離し、その上澄みを採取することとされている。しかし、試料が多量の油を含有する場合は、その油が上澄みの上に浮いていることがある。分析法の原理から、その場合は油を除いた抽出液を採取して操作を続けるものと解されるが、水性の TMAH 溶液で抽出できない脂溶性のヨウ素化合物が油中に存在していた場合、分析値はその分だけ低くなる可能性がある。そこで、そのことを確認するため、水溶性および脂溶性ヨウ素化合物の分離定量を行った。アルカリ灰化を用いる 2 方法とマニュアル法とで分析値の乖離が大きく、その差がアルカリ灰化—ICP-MS 法の定量限界である 0.20 mg/kg を超えたマサバおよびマイワシについて、実験方法の 4. の (2) で示した方法により、ヨウ素を

Table 3 Determined iodine after water and oil phase separation

Samples	Measured value (mg/kg as I)		
	a) Hydrophilic iodine compounds in water phase	b) Lipophilic iodine compounds in oil phase	a) + b)
Chub mackerel	0.46±0.03	0.16±0.02	0.62±0.01
Sardine	0.24±0.06	0.36±0.10	0.60±0.04

A mean value±standard deviation of duplicate measurements is shown.

分析した。

Table 3. に示したとおり、2 魚種ともに脂溶性ヨウ素化合物が検出された。魚類の脂質中に 0.5%TMAH 溶液では抽出できない形態のヨウ素化合物が存在することが分かり、本法ではそれらを包括的に脂溶性ヨウ素化合物と呼ぶこととしたが、その同定には至らなかった。また、水溶性および脂溶性ヨウ素化合物の合計値はアルカリ灰化—ICP-MS 法の分析値に近い値を示した（アルカリ灰化—ICP-MS 法の分析値に対する合計値の比として、マサバ 0.94 およびマイワシ 1.08）。このことから、前処理でアルカリ灰化処理を行うことで、脂溶性の有機ヨウ素化合物が無機化されて測定可能になるものと考えられた。なお、マサバの脂溶性ヨウ素化合物の定量値はアルカリ灰化—ICP-MS 法の定量限界である 0.20mg/kg を下回った。しかし、定量値には相対標準偏差として 0.02/0.16=13% の精度があると推定されること、また、試料量を 6g とすることにより ICP-MS における測定値として 0.1 µg/L 以上を確保したことから、定量値には一定の信頼性があるものと考えられた。

6. CRM の測定

脂溶性ヨウ素化合物がアルカリ灰化により測定可能になることが分かったものの、同じ前処理を用いる 2 方法（GC 法および ICP-MS 法）で市販の食用魚類に対する分析値に大きな差が認められたため、いずれが妥当な値であるかを CRM の分析により評価した。Table 4. に 3 方法による分析値を乾物換算値として示した。GC 法について、分析値と認証値の差 0.8mg/kg は、認証値および分析値の拡張合成不確かさ（0.3mg/kg, $k=2$ ）を上回り、差は統計的に有意であると判定された。

GC 法では、アルカリ灰化した試験溶液中のヨウ化物イオン (I^-) を酸性下でヨウ素分子 (I_2) とし、これを 2-ブタノンと反応させ、生成した 3-ヨード-2-ブタノンを測定する。反応は系内の共存成分に影響を受けるため、測定値は 2-ブタノンのグレード（製造者）および試料マトリックスに依存する。さらに試料によっては、試料溶液の分取量に応じて測定値が変化する場合がある。したがって、同法で良好な真度を得るためには、標準溶液と試料溶液の反応率

Table 4 Test results for CRM*

Samples	Measured value (mg/kg)		
	Standard method	Alkaline ashing -GC	Alkaline ashing -ICP-MS
ERM [®] -BB422	1.2±0.1	2.2±0.1	1.2±0.1

A mean value ± standard deviation of duplicate measurements is shown.

*Certified value±expanded uncertainty ($k=2.78$): 1.4±0.4 mg/kg

が同等となるような条件を精査し、適用しなければならない。今回、CRM の分析では試料量を 2.5 g、試料溶液の分取量を 2mL とした。その際の反応率を確認するため、試料溶液に 0.1 および 0.2 µg のヨウ素をヨウ化ナトリウムとして添加して試験したところ、回収率はそれぞれ 153 および 133% となり、共存成分の影響で試料溶液の反応率が標準溶液のそれを上回ったものと考えられた。また、分取量を 2mL とした場合の GC の測定値はいずれも 0.0118 mg/L であった。ここで、分取量を 5 および 10 mL とすると、測定値はそれぞれ 0.0295 および 0.0590 mg/L となることが期待される。しかし、実際に得られた値は 0.0055 および 0.0014 mg/L であり、分取量の増加に応じて反応率が顕著に低下する現象が確認された。以上のことから、2~5 mL の範囲のどこかには回収率が 100% となる最適な分取量があるものと推察されたが、実際の成分表の分析において、常に反応率を確認しながら測定を行うことは困難と考えられた。したがって、魚類試料に対し GC 法は真度の制御に課題があり、魚類中のヨウ素の分析法として適当ではないと考えられた。

一方、マニュアル法およびアルカリ灰化—ICP-MS 法の分析値と認証値の差はいずれも 0.2mg/kg であった。これらは認証値および分析値の拡張合成不確かさ（いずれも 0.3mg/kg, $k=2$ ）を下回り、差は統計的に有意でないと判定された。したがって、CRM については、2 方法の真度に問題はないと考えられた。なお、マニュアル法で良好な真度が得られた理由として、CRM の魚種であるセイウチはタラ科の魚類で脂質含量が 10~20mg/g と非常に低く¹⁶⁾、脂溶性のヨウ素化合物を殆ど含まなかったためと推察された。

7. 分析法バリデーション

以上の検討のとおり、アルカリ灰化—ICP-MS 法は脂溶性ヨウ素化合物の測定が可能であり、また、CRM の分析値も良好であったことから、成分表における新規分析法として有力な候補と考えられた。そこで、同法について単一試験所バリデーションを実施した。

(1) 検量線

検量線の一例を Fig. 1. に示した。最小二乗法による濃度 x (µg/L) に対する応答値（イオンカウント数）の比（ヨウ

Fig. 1 Calibration curve

Table 5 Recovery test results for selected fish

Samples	Added concentration (mg/kg as I)	Recoveries (%)*
Amberjack	0.33	93±4
Skipjack tuna	0.33	96±7
Chub mackerel	0.67	85±9
Sardine	0.67	94±8

*A mean value ± standard deviation of triplicate measurements is shown.

素/テルル) y の一次回帰式は $y=0.0965x+0.0039$ であった。 y 切片の標準偏差は 0.00053 であり、これを傾きで除した値は最小測定濃度 $0.1 \mu\text{g/L}$ の $1/10$ 以下であった。また、 $0\sim 10 \mu\text{g/L}$ の範囲で相関係数は 0.9999 以上であり、広範囲において良好な直線性が確認された。

(2) 真度および適用性

真度および適用性は、種々の魚種に対する添加回収試験で評価した。前述したとおり、魚類中には様々な化学形態でヨウ素が存在するものと推察されるが、これらは前処理のアルカリ灰化で無機化すると考えられる。そこで、食用魚類の各試料に検出濃度に近い濃度となるように代表的な無機ヨウ素化合物であるヨウ化ナトリウムを添加して分析し、次式により回収率 (R) を求めた。

$$R(\%) = \frac{(C_1 - C_0) \times w}{A} \times 100$$

ここで、 C_1 : 添加試料の定量値 (mg/kg), C_0 : 無添加試料の定量値 (mg/kg), w : 添加試料の秤取量 (g) および A : 添加量 (μg) である。回収率は $85 \pm 9\%$ から $96 \pm 7\%$ であった (Table 5)。Codex マニュアル¹⁷⁾ のクライテリアアプローチでは、標準試験法に求められる回収率の基準を $0.1\sim 1 \text{ mg/kg}$ の濃度レベルで $80\sim 110\%$ と定めており、それに照らして回収率は良好であった。したがって、6. で示した CRM の測定結果と合わせ、真度は良好と判断された。また、検討した 4 種魚類全てに対して良好な結果が得られたことから、広く一般の魚類について適用可能であること

Table 6 Repeated analytical results for sardine

Trials	Measured value (mg/kg)				
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Trial 1	0.584	0.540	0.645	0.617	0.610
Trial 2	0.577	0.591	0.553	0.635	0.516

Total mean value : 0.587 mg/kg

One-way ANOVA table

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Estimated variance
Between days	0.00549	4	0.00137 (V_A)
Within day	0.01014	5	0.00203 (V_r)
Total	0.01563	9	

が示唆された。

(3) 精度

精度は代表試料 (マイワシ) の繰り返し分析 (2 併行分析 $\times 5$ 日間) で評価した。なお、本試験は 4. で結果を示した 3 方法の比較分析とは別に実施した。得られた定量値について各日のデータを 1 群とし、5 群について一元配置分散分析を行った (Table 6)。分散分析の結果に基づき、次式により併行精度 (S_r) および中間精度 (S_{IM}) を推定し、これらを全平均で除して相対併行標準偏差 (RSD_r) および相対中間標準偏差 (RSD_{IM}) を求めた。

$$S_r = \sqrt{V_r} \text{ および } S_{IM} = \sqrt{V_r + \frac{V_A - V_r}{n}}$$

ここで、 V_r : 群内分散の推定値, V_A : 群間分散の推定値 および n : 1 日の測定数である。ただし、今回の実験では日間変動が小さく $V_r > V_A$ となったため、 S_{IM} は $V_A - V_r = 0$ として算出した。したがって、 RSD_r および RSD_{IM} はいずれも 7.7% と算出された。Codex ガイドライン¹⁸⁾ では、併行精度の HorRat (r) 値 (Horwitz 式¹⁹⁾ による室間再現精度の予測値に対する併行精度の比) の正常範囲を $0.3\sim 1.3$ としている。これは 1 mg/kg の濃度レベルで算出すると $4.8\sim 20.8\%$ であり、それに照らして精度は良好と判断された。

(4) 定量限界

定量限界は低濃度における測定値の標準偏差が一定と仮定し、ブランク試験の繰り返しにより評価した。ヨウ素を含まない魚類試料の入手は困難であったため、試料を用いず中間条件で試験を 10 回繰り返し、得られた結果を統計的に解析した。10 回の測定値 (試料溶液濃度として $-0.0100\sim 0.0444 \mu\text{g/L}$) の標準偏差 (σ) は $0.0198 \mu\text{g/L}$ であり、 10σ 値は $0.198 \mu\text{g/L}$ と算出された。得られた値について、試料量を 5 g とした場合の試料中の濃度に換算すると、 $0.198 \mu\text{g/L} \times 100 \text{ mL} / 5 \text{ g} \times 50 = 0.198 \text{ mg/kg}$ と算出された。そこから、本法の定量限界を 0.20 mg/kg に設定し

た。

なお、成分表でヨウ素の含有量が収載されている魚類は食品番号として59種類存在している。その中で収載値が0.20 mg/kg未満のものは、魚種として、まあじ、あなご、あゆ、うなぎ、かじき類、かんぱち、さけ・ます類、たい類、ひらめ、はまち、ほっけおよびまぐろ類があり、食品番号として27種類である。本法で脂溶性ヨウ素化合物が測定可能となることにより、測定値が0.20 mg/kg以上となる可能性はあるものの、これらの食品の一部は本法では定量限界未満となるものと考えられた。

分析法バリデーションの結果として、アルカリ灰化—ICP-MS法は検量線、真度、精度および適用性のいずれも良好であり、分析マニュアルに記載する方法として適していると判断されたため、同法を成分表における魚類中ヨウ素の新規分析法として提案した。ただし、定量限界はマニュアル法の0.01 mg/kgに及ばなかったため、適用範囲は0.20 mg/kg以上のヨウ素を含有する魚類とした。

要 約

魚類の脂質中にはマニュアル法では測定できない脂溶性ヨウ素化合物があり、魚種によっては定量値が低くなることが分かった。脂溶性ヨウ素化合物を測定するためにはアルカリ灰化処理が有効と考えられたが、GC法は真度の制御に課題があった。一方、アルカリ灰化—ICP-MS法は検量線、真度、精度および適用性が良好であり、脂溶性ヨウ素化合物も測定することができた。ただし、定量限界はマニュアル法の0.01 mg/kgに及ばず0.20 mg/kgであった。そのため、成分表に収載された魚類59食品のうち、27食品の一部については、同法では測定値を得ることができないものと考えられた。そこで、ヨウ素の含有量が0.20 mg/kg以上の魚類に対し、同法を適用することを提案した。

本研究の成果の一部は、文部科学省の委託事業により得られたものです。ご助言いただいた検討委員会の先生方および文部科学省のご担当官に感謝申し上げます。また、魚油の試料をご提供いただいた一般財団法人日本水産油脂協会様に謝意を表します。

文 献

- 1) 厚生労働省 (2014). 「日本人の食事摂取基準 (2015年版)」策定検討会報告書。
- 2) Leung, A.M. and Braverman, L.E. (2012). Iodine-induced thyroid dysfunction. *Thyroid*, **19** (5), 414–419.
- 3) World Health Organization (2009). Iodine and inorganic iodides: Human health aspects, Concise International Chemical Assessment Document 72.
- 4) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会 (2015). 日本食品標準成分表 2015年版 (七訂)。
- 5) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会 (2015). 日本食品標準成分表 2015年版 (七訂) 分析マニュアル。

- 6) Piñeiro, A.M., Hortas, V.R., and Barerra, P.B. (2011). A review on iodine speciation for environmental, biological and nutrition fields. *J. Anal. At. Spectrom.*, **26**, 2107–2152.
- 7) Dressler, V.L., Antes, F.G., Moreira, C.M., Pozebon, D., and Duarte, F.A. (2011). As, Hg, I, Sb, Se and Sn speciation in body fluids and biological tissues using hyphenated-ICP-MS techniques: A review. *Int. J. Mass Spectrom.*, **307**, 149–162.
- 8) Bhagat, P.R., Acharya, R., Nair, A.G.C., Pandey, A.K., Rajurkar, N.S., and Reddy, A.V.R. (2009). Estimation of iodine in food, food products and salt using ENAA. *Food Chem.*, **115**, 706–710.
- 9) Akhter, P., ur-Rehman, K., Orfi, S.D., and Ahmad, N. (2004). Assessment of iodine levels in the Pakistani diet. *Nutrition*, **20**, 783–787.
- 10) Eckhoff, K.M. and Maage, A. (1997). Iodine content in fish and other food products from east Africa analyzed by ICP-MS. *J. Food Compos. Anal.*, **10**, 270–282.
- 11) Pacquette, L.H., Levenson, A.M., and Thompson, J.J. (2012). Determination of total iodine in infant formula and nutritional products by inductively coupled plasma/mass spectrometry: Single-laboratory validation. *J. AOAC Int.*, **95** (1), 169–176.
- 12) Fecher, P.A., Goldmann, L., and Nagengast, A. (1998). Determination of iodine in food samples by inductively coupled plasma mass spectrometry after alkaline extraction. *J. Anal. At. Spectrom.*, **13**, 977–982.
- 13) Knapp, G., Maichin, B., Fecher, P., Hasse, S., and Schramel, P. (1998). Iodine determination in biological materials. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **362**, 508–513.
- 14) Meyer, U., Weigel, K., Schöne, F., Leiterer, M., and Flachowsky, G. (2008). Effect of dietary iodine on growth and iodine status of growing fattening bulls. *Livest. Sci.*, **115**, 219–225.
- 15) Kuwahira, H. and Asai, Y. (1994). Determination of iodine in foods by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Food Hyg. Safe. Sci. (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, **35** (3), 253–257 (桑平秀夫, 浅居良輝, 電気化学検出器付 HPLC による数種食品中の微量ヨウ素の定量, 食品衛生学雑誌)。
- 16) Wiborg, M.L., Knutsen, H.K., Andersson, Ö., Büchert, A., Cederberg, T., Darnerud, P.O., Hallikainen, A., Kiviranta, H., Ólafsdóttir, K., Petersen, K., Rajakangas, L., and Sletta, A. (2008). Appendices XXIII. In “EU maximum levels for dioxins and dioxin-like PCBs - Impact on exposure and food supply in the Nordic countries”, Nordic Council of Ministers, Copenhagen, p. 93.
- 17) Codex Alimentarius Commission (2015). Principles for the establishment of Codex methods of analysis, In “Procedural manual”, 23rd edition, Secretariat of the Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rome, p. 70.
- 18) Codex Alimentarius Commission (2009). Guidelines on Analytical Terminology (CAC/GL 72-2009)
- 19) AOAC INTERNATIONAL (2012). Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements, In “Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL”, 19th edition, Latimer, G.W., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, p. 2.

引用 URL

- i) 消費者庁. 栄養成分等の分析方法等 (平成 27 年消費表第 139 号別添), http://www.caa.go.jp/foods/pdf/160331_tuchi4-betu2.pdf (2016.11.04)
(平成 28 年 11 月 4 日受付, 平成 29 年 1 月 30 日受理)