

食品中に含まれる微量農薬の分析法と精度管理体制の構築に関する研究

布川徹、徳崎健史、苗床江理、山口理香

主任研究者 小島幸一（財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 所長）

研究分担者 尾花裕孝（大阪府立公衆衛生研究所 食品化学課長）、畠山えり子（岩手県環境保健研究センター）、土田由里子（新潟県保健環境科学研究所）、上野英二（愛知県衛生研究所）、田中健（奈良県保健環境研究センター）、田中敏嗣（神戸市環境保健研究所）、佐々木珠生（広島市衛生研究所）、堤泰造（徳島県保健環境センター）

平成 21 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）検査機関の信頼性確保に関する研究

平成 21 年度総括・分担研究報告書（尾花裕孝）、p21-91(2010)

食品中の残留農薬基準は、主に使用後の残留を監視する目的で生鮮農産物を対象に設定されており、検査体制もそれに則っている。

そのため、加工食品や冷凍食品に対しては、残留農薬分析は行われていなかった。

しかし、加工食品に対する不安が急激に増大し、これを受けて加工食品に対する農薬分析の需要が喚起された。そこで、加工度が高く脂質を含む加工品を対象に分析法を考案、例示し、消費段階の分析機関である地方衛生研究所で、加工食品中の農薬分析への対応の可否を検証した。

参加した地方衛生研究所は9機関で、検証方法としては内部精度管理試験および外部精度管理試験等を実施した。今年度、精度管理用試料には、パンケーキを用いた。

添加農薬は、有機リン系・カーバメート系・水溶性の高い農薬など 10 種類を選択した。

北九州市の分析法の概略は次の通り。

吸水剤として硫酸マグネシウムと混合した試料より、酢酸エチルで農薬成分を抽出し、アセトニトリル分配で脱脂した後にグラファイトカーボンおよびエチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル固相カートリッジで精製を行って、GC および LC の質量分析計で測定した。

全機関で添加試料を用いた外部精度管理試験を行い、平均回収率と変動係数を算出した。

品質管理などに用いられている \bar{X} -R 管理図や、Z スコアによる評価を行った結果、全ての測定農薬で全項目が適正範囲に入ったのは 3 機関のみであり、その他の 6 機関では一つ以上の項目が適正範囲に入らなかった。

原因として、通常は GC-MS で測定する農薬を LC-MS/MS で測定したことに起因する。つまり、低極性農薬を GC で測定し、GC で測定困難な農薬のみを LC で測定することを想定していたため、全農薬を LC で測定することは想定外であり、試験液の含水率によって農薬の溶解度が低下し、不具合の原因となったと考えられた。

LC/MS を用いた食品中残留農薬等測定における基礎的研究

～試験液中の水の及ぼす影響～

北九州市環境科学研究所 ○苗床江理、山口理香、布川 徹、徳崎健史、森下正人
 全国衛生化学技術協議会
 平成 21 年 11 月(盛岡市)

I はじめに

食品中残留農薬等の LC/MS 測定への影響因子として、食品マトリックスについては周知されているが、試験液中の水については意外と知られていない。そこで今回、試験液中の水が LC/MS 測定に及ぼす影響に関する試験を行ったのでその結果を報告する。

II 方法

試験 1 農薬の水溶性と試験液溶媒の含水率との関係を調べるために、市販の農薬混合標準液を含水率 5 段階(0,25,50,75,100%)の水/メタノール混合溶液で希釈し、20ppb の標準試験液を調製し、95 種の農薬(表 1 参照)について LC/MS/MS 測定を実施した。

試験 2 食品マトリックスや調製法からの影響についても考察するために、精製・未精製の食品マトリックス成分を添加した試験液や試験液調製前の転溶の操作不十分を想定した微量トルエン混在試験液についても同様に調製・測定した。

(1) LC/MS 試験液の調製法

試験 1 マトリックス無添加の標準試験液として、農薬混合標準液を水/メタノール混合溶媒(含水率: 0,25,50,75,100%)を用いて希釈し、各 20ppb に調製。

試験 2① 未精製マトリックス試験液として冷凍餃子を「食品中に残留する有機リン系農薬に係る試験法(平成 20 年 3 月 7 日付厚労省事務連絡)」に従い得たマトリックス成分を添加し、**試験 1**と同様に調製。

試験 2② 精製マトリックス試験液として、カボチャを「LC/MS による農薬等の一斉試験法(農産物)(平成 17 年 11 月 25 日付厚労省通知)」に従い得たマトリックス成分を添加し、**試験 1**と同様に調製。

試験 2③ 試験液調製前の転溶操作不十分を想定し、②の試験液 1mL に 50 μL トルエンを添加したもの。

(2) 農薬標準試薬

林純薬工業(株)農薬混合溶液 Mix4,5,6,7 の 4 種

(3) 測定機器条件 表 2 のとおり。

表 2 測定機器条件

HPLC	
装置:	Waters 社 Acquity UPLC System
カラム:	Waters 社 Acquity UPLC BEH C ₁₈ 2.1mm × 100mm
カラム温度:	40°C
流速:	0.3mL/分 注入量: 5 μL
グラジェント条件:	
A:	5mMCH ₄ COOH-Aq
B:	5mMCH ₄ COOH-MeOH
0 分	A95%→1 分 A60%→15 分 A5%
→20 分	A5%→20.5 分 A95% (22 分)
LC/MS	
装置:	Waters 社 Quattro Premier XE
イオン化法:	ES+/ES- MRM
キャピラリー電圧:	3kV
イオン源温度:	120°C

表 1 95 種の対象農薬名とそのグループ分類 ※平成 17 年 11 月 25 日付厚労省通知別表の値

A	相対保持時間*が 0.8 未満の農薬の 11 種 (比較的水溶性高のグループ) Aldoxycarb, Methomyl, Oxamy, Thiamethoxam, Imidacloprid, Clothianidin, Chloridazon, Oxycarboxine, Thiacloprid, Thiabendazole, Aldicarb
B	相対保持時間*が 0.8 以上 1.2 未満の農薬の 42 種 (比較的水溶性中間のグループ) Bendiocarb, Azamethiphos, Carbofuran, Tebuthiuron, Monolinuron, Carbaryl, Thiodicarb, Tralkoxydim, Pirimicarb, Dimethirimol, Methabenzthiazuron Furametpyr, Isoxaflutole, Azafenidin, Phenmedipham, Azinphosmethyl, Pyrifthalid, Fluridon, Fenobucarb, Azoxystrobin, Dimethomorph, Acibenzolar-S-methyl, Fenamidone, Ferimzone, Dimethomorph, Methiocarb, Boscalid, Chloroxuron, Dymuron, Iprovalicarb, Triticonazole, Epoxiconazole, Simeconazole, Flufenacet, Cumyluron, Oryzalin, Diflubenzuron, Iprodione, Cyazofamid, Naproanilide, Tebufenozide, Tetrachlorvinphos
C	相対保持時間*が 1.2 以上の農薬 42 種 (比較的水溶性低のグループ) Mepanipyrim, Fenoxycarb, Imazalil, Indanofan, Anilofos, Pyraclostrobin, Clofentezine, Triflumuron, Cyflufenamid, Pyrazolynate, Cycloate, Carpropamid, Di-allate, Indoxacarb, Quinalofop-ethyl, Novalron, Quinalofop-P-tefuryl, Aramite, Benzofenap, Teflubenzuron, Pencycuron, Furathiocarb, Lactofen, Clomeprop, Fenpyroximate, Cloquintocetmexyl, Hexaflumuron, Flufenoxuron, Cycloprothrin, Fenoxaprop-ethyl, Oxaziclonemefone, Pentoxazone, Fenpyroximate, Propaquizafop, Lufenuron, Hexythiazox, MilbectinA ₃ , SpinosynA, Abamectin, MilbectinA ₄ , SpinosynD, Tridemorph

III 結果

今回、農薬の水溶性の指標に相対保持時間を採用し、表1のとおり95種の農薬をA,B,Cの3グループに分類し、個々の農薬ではなく、グループ別平均値で結果を纏めた。

試験1 (マトリックス無添加) 標準試験液

図1に、試験液含水率に対して、各農薬の相対ピーク面積(試験液含水率0%を100とした)の各農薬グループ別平均の挙動を表した。

水溶性低のグループCは、含水率50%以上から上がるにつれてピーク面積の減少の傾向を示し、含水率100%では相対ピーク面積は数%にも大幅に減少した。水溶性中間のグループBでは、その傾向はグループC程ではないものの、同様に減少傾向を示した。水溶性高のAグループは、含水率に関わらず、一定のピーク面積を保った。

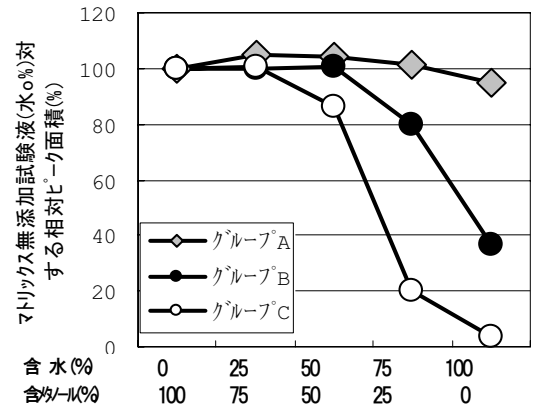


図1 マトリックス無添加標準試験液における各農薬グループの挙動

試験2 精製や未精製の試験液や微量トルエン混在の試験液

精製カボチャや未精製餃子の試験液や微量トルエン混在試験液の結果の内、グループAとグループCのものについて、グループ別に図2と図3に示した。

水溶性低のグループC(図3参照)では、マトリックス無添加のものと、精製カボチャ試験液は殆ど同値を示した。未精製餃子の試験液は、含水率25~50%の範囲でマトリックス無添加よりも大幅に減少する傾向を示した。

水溶性高のグループA(図2参照)では、未精製餃子の試験液が約2割の減少傾向を示したものの、その他の試験液は全て、含水率に関わらず一定のピーク面積を保った。

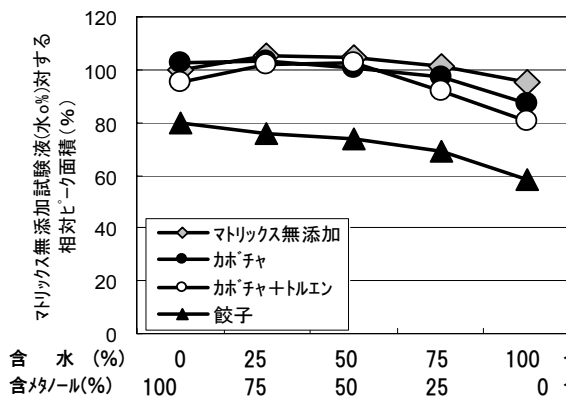


図2 農薬グループAの挙動

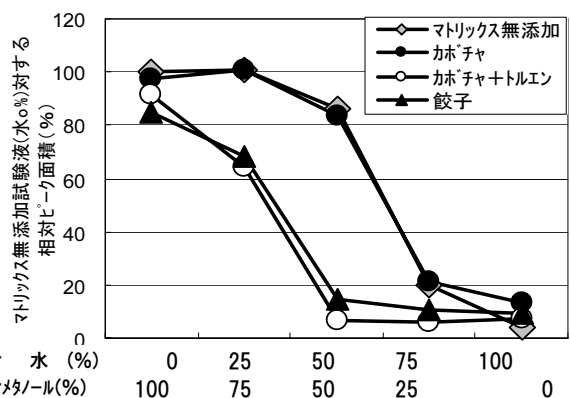


図3 農薬グループCの挙動

IV まとめ

- 1 含水率0%(メタノール100%)の試験液が食品マトリックスや他の溶剤が混在した場合であっても、農薬の水溶性に関わらず高い値となった。
- 2 水溶性低の農薬は、含水率大に伴い、容器壁等への吸着などにより減少傾向を示した。また、未精製マトリックス成分や微量トルエンが混在した場合、農薬の一部がマトリックス層やトルエン層へ移行し、更に値が減少した。
- 3 水溶性高の農薬は、含水率に関わらず値は高く安定した。但し、未精製試験液の場合は、今回約2割減少した。
- 4 「LC/MSによる農薬等の一斉試験法(農産物)」のカボチャ試験液の精製状態は良好で、標準溶液と殆ど同値であった。しかし、今回設定したトルエン溶媒除去の操作不十分の条件下では、未精製試験液レベルまで値が減少した。
- 5 これらは、農薬の水溶性を考慮したLC/MS試験液の溶媒選択が重要であると示した。含水率高い溶媒の使用には、水溶性高の農薬のみを対象の測定であれば問題は無いが、対象に水溶性低の農薬を含む測定であれば問題が生じることが示された。

残留農薬に関するポジティブリスト制度導入に係る新規分析法開発・検証

苗床江理、山口理香、布川徹

厚生労働省受託（共同研究者 国立医薬品食品衛生研究所、広島県立総合技術研究所）

1 はじめに

平成 17 年のポジティブリスト制度が導入され、食品中の残留農薬は全て規制されている。その規制の多くは暫定基準によるものである。そのため、健康影響評価等を審議された農薬の残留基準が、逐次設定がなされている。農薬の残留基準の告示等を行うには、その試験法が開発され、その妥当性評価(検証)がなされていなければならない。

今回当所は、残留基準の告示等が予定されている農薬 57 品目を対象とした試験法の妥当性評価する試験に参加し、実施した。なお、これは厚生労働省受託事業である。

2 試験の概要

まず、農産物 10 作物対象に、試験法「GC/MS による通知一斉試験法(農産物)」(H17 年 1 月 24 日付厚生労働省通知食安発第 0124001 号)で添加回収試験を 1 日 1 回(2 併行)、2 日間分析する枝分かれ実験(図 1 参照)等を実施する。具体的な試験内容を表 1 に示す。

その試験結果から、5 項目(選択性、真度、精度(併行精度及び室間精度)、定量限界、試料マトリックス影響)について、この試験法の妥当性の評価を行う。

この評価方法は、「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について」(H19 年 11 月 15 日付厚生労働省通知食安発第 1115001 号)に準ずるもの。

なお、評価項目の精度の室間精度は、同様に実施した他の 2 機関の結果と併せて求められるものである。

表 1 試験内容

- (1) 添加回収試験等により主に以下の項目について検討
 選択性 (n=1/日を 2 日間、標準添加濃度：定量限界レベル)
 真度 (n=2/日を 2 日間、標準添加濃度：2 種)
 精度 (n=2/日を 2 日間、標準添加濃度：2 種)
 定量限界 (n=1/日を 2 日間、標準添加濃度：定量限界レベル)
 試料マトリックス影響
 (n=1/日を 2 日間、標準添加濃度：定量限界レベル 1 種)
- (2) 実施試験法：GC/MS による通知一斉試験法(農産物)
- (3) 対象食品：農産物 10 作物(玄米、大豆、落花生、ナ、馬鈴薯、リンゴ、オレンジ、杓苳草、キャベツ、茶)
- (4) 分析装置：GC/MS
- (5) 対象農薬：57 品目 表参照
- (6) 標準添加濃度：①0.1ppm②定量限界レベル(およそ 0.01ppm)

表 2 対象農薬品目

α,p'-DDT、p,p'-DDT、α-エンドスルファン、β-エンドスルファン、アクリナトリン、アザコナゾール、アゾキシストロピン、アトラジン、アラクロール、アルドリリン、イソプロチオラン、エンドリン、カフェンストロール、キノクラミン、クレソキシムメチル、クロメプロップ、クロルフェナピル、クロルフェンソン、クロルプロファミ、シアナジン、ジクロブトラゾール、ジクロラン、ジチオピル、シハロホップブチル、ジフェノコナゾール、シフルトリン、シフルフェナミド、シメコナゾール、ジメチピン、デルタメトリン、トリアレート、トリブホス、トリフルミゾール、ハルフェンブロックス、ピオアレスリン、ピフェノックス、ピフェントリン、ピラゾホス、ファミフル、フィプロニル、フェナリモル、フェンクロルホス、フェンパレレート、フェンプロパトリン、フサライド、プロフェジン、フルキンコナゾール、フルシトリネート、フルトラニル、フルバリネート、プロモブチド、プロモプロピレート、プロモホス、ベンフルラリン、ミクロブタニル、メタミドホス、モリネート 計 57 品目

表 3 真度 精度の評価基準

濃度 (ppm)	試行回数	真度 (%) (回収率)	併行精度 (RSD%)	室間精度 (RSD%)
≤ 0.001	1 日 1 回 (2 併行) 2 日間	70 ~ 120	30 >	35 >
0.001 < ~ ≤ 0.01		70 ~ 120	25 >	30 >
0.01 < ~ ≤ 0.1		70 ~ 120	15 >	20 >
0.1 <		70 ~ 120	10 >	15 >

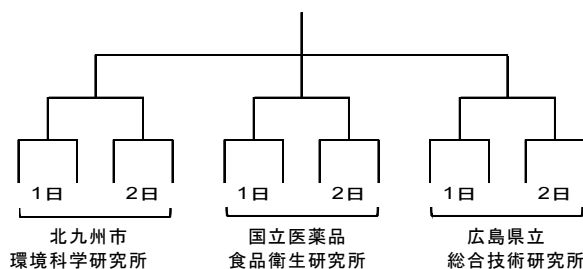


図 1 枝分かれ実験

3 結果

今後、国立医薬品食品衛生研究所、広島県立総合技術研究所と併せての 3 機関の試験結果から、対象農薬について当試験法の妥当性評価を厚生労働省が行う。

食品中残留農薬に関する一日摂取量実態調査

徳崎健史

厚生労働省受託

1 目的

北九州市における市民の食品由来の農薬摂取の実態を把握するために、マーケットバスケット方式の試料について、低濃度測定が可能な LC/MS/MS を用いて残留農薬測定を行った。なお、当調査は平成 21 年度厚生労働省受託事業である。

2 試料の調製法

調査対象食品は「平成 18 年度国民栄養調査」の食品分類と食品別摂取量を参考に、市内の市販食品（購入時期：平成 21 年 12～1 月）と飲料水の 169 品目について、14 の食品群に分類後、摂取量比に分取し均一化した(表 1)。なお、未調理の食品は調理加工した。

3 試験法

3.1 前処理 ①1～3 群、5～9 群、12～14 群

平成 17 年 1 月 24 日付食安発 0124001 号厚労省通知の LC/MS による農薬の一斉試験法(農産物)に準じて行った。

② 4 群、10 群、11 群

試料 5.0g にヘキサン 30mL を加え均一化したものに、ヘキサン飽和アセトニトリル 30mL(2 回目 30mL、3 回目 30mL)と無水 Na₂SO₄10g を加えホモジナイズした後、ろ過した。濃縮後、PSA ミニカラム精製を行った。溶媒除去後、メタノール 5mL にて定容した。

3.2 測定

LC/MS/MS 測定を行った。表 3 に測定装置条件を、表 4 に 40 種の対象農薬名及びビオン化条件を示す。

表 1 食品群と群別積算 ADI%

群	主成分	群別積算 ADI(%)
1	米類	-
2	穀類・芋類	-
3	砂糖類・菓子類	-
4	油脂類	-
5	豆類	-
6	果実類	0.000088
7	緑黄色野菜類	0.12
8	淡色野菜類・海草	0.052
9	調味・嗜好飲料	-
10	魚介類	-
11	肉類・卵類	-
12	乳類	-
13	その他の食品	-
14	飲料水	-

4 添加回収試験

7 群、8 群、11 群、14 群試料の添加回収試験(標準品添加濃度 0.5ppm 相当)の結果を表 5 に示す。平均回収率は、7 群=91.9%、8 群=88.5%、11 群=67.3%、14 群=93.9%とほぼ良好であった。

5 結果

5 種の農薬を検出した(表 2)。検出農薬の摂取量は ADI(一日摂取許容量)の 0.12～0.000088%となり、今回調査した 40 種の農薬については、健康上問題のないレベルと分かった。

参考までに、検出農薬の群別摂取量の ADI 比を群別に積算したところ(表 1)、果実類の 6 群から 0.000088%、野菜類の 7 群、8 群から 0.12%、0.052%摂取される傾向が分かった。

表 2 検出農薬一覧

農薬名	用途	一日摂取量(μg)(n=3)		ADI (ug/50kg 体重/日)	ADI 比 (%)
		総量	群別		
チアベンダゾール	殺菌剤	0.0044	0.0044 (6 群)	5000	0.000088
インドキサカルブ	殺虫剤	0.32	0.19 (7 群)、0.13 (8 群)	260	0.12
シアゾファミド	殺菌剤	0.20	0.031(7 群)、0.17 (8 群)	8500	0.0024
メパニピリム	殺虫剤	0.57	0.57 (7 群)	1200	0.0048

表3 HPLC-LC/MS/MS 装置条件

装置: Waters AQUITY UPLCTM システム/Waters Quattro Premier XE
 カラム: Waters AQUITY UPLCTM BEH C18 1.7um 2.1×100mm
 移動相: A 5mM 酢酸アンモニウム水溶液 / B 5mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液
 B%(min)=5(0)→40(1)→95(12)→95(20)→5(20.5)
 カラム温度: 40°C 流速: 0.3mL/min 注入量: 3uL
 イオン化モード: エレクトロスプレー(ESI+/ESI-) キャピラリー電圧: 1kV イオン源温度: 120°C

表4 農薬名、LC/MS/MS イオン化条件

農薬成分名	保持時間(分)	モード	定量イオン				定性イオン			
			フリッカー- m/z	プロダクト m/z	コ-ン電圧 (V)	コロリジョンエネルギー (eV)	フリッカー- m/z	プロダクト m/z	コ-ン電圧 (V)	コロリジョンエネルギー (eV)
アザメチホス	4.1	ESI+	325.0	182.7	20	15	327.0	184.7	20	15
アジンホスメチル	6.6	ESI+	318.0	131.8	20	15	318.0	76.9	15	35
アニコホス	9.9	ESI+	368.0	198.5	25	15	370.0	198.5	25	15
アラマイト	12.0	ESI+	352.1	190.9	20	15	352.1	56.9	20	30
アルトキシカルブ	1.9	ESI+	223.1	85.9	25	15	223.1	147.8	25	10
イブロジオン	9.2	ESI+	330.0	245.0	25	15	332.0	247.0	25	10
イマザリル	9.8	ESI+	297.1	158.8	35	20	299.1	160.8	35	20
インキサカルブ	11.1	ESI+	528.1	203.0	25	45	528.1	150.0	25	45
オキサジクロメホン	11.6	ESI+	376.1	189.8	20	15	378.1	189.8	20	15
オキシカルボキシ	3.0	ESI+	268.1	146.6	20	25	268.1	174.1	20	20
カルバリル	4.9	ESI-	202.1	144.9	15	15	202.1	126.9	15	30
カルボフラン	4.4	ESI+	222.1	164.9	20	15	222.1	122.8	20	15
クミロン	8.2	ESI+	250.0	184.7	25	10	303.1	124.8	25	25
クロチアニジン	2.5	ESI+	395.2	169.0	15	15	250.0	131.8	15	15
クロマフェノジド	8.5	ESI+	303.1	175.0	15	10	395.2	339.2	15	10
クロダゾ	2.7	ESI+	222.0	103.8	40	25	222.0	91.8	40	25
シアゾファミド	9.0	ESI+	499.1	107.7	15	15	327.1	107.7	15	15
シクロプロトリン	13.2	ESI+	325.1	181.1	20	35	499.1	229.0	20	25
ジフルベンズロン	9.3	ESI+	311.0	157.8	20	15	311.0	140.8	20	35
シメコナゾール	8.8	ESI+	294.1	69.9	25	20	294.1	134.9	25	20
ジメトモルブ	7.5	ESI+	388.1	300.7	35	20	388.1	164.8	35	30
ジメトモルブ	8.1	ESI+	388.1	300.7	35	20	388.1	164.8	35	30
スピノサ H	14.0	ESI+	746.5	141.9	45	30	746.5	98.0	45	65
スピノサ H	14.5	ESI+	746.5	141.9	45	30	746.5	98.0	45	65
チアベンダゾール	3.6	ESI+	202.0	174.6	45	25	202.0	130.7	45	30
チオジカルブ	5.2	ESI+	355.1	88.0	15	15	355.1	108.0	15	15
テブチウロン	4.6	ESI+	229.1	171.8	30	20	221.0	115.8	30	25
テフルベンズロン	12.2	ESI+	381.0	157.9	25	15	381.0	140.7	25	35
トデモルブ	15.2	ESI+	298.3	130.1	50	25	298.3	98.0	50	30
トデモルブ	15.7	ESI+	298.3	130.1	50	25	298.3	98.0	50	30
ナプロアニリド	9.2	ESI+	292.1	170.9	20	15	292.1	119.9	20	15
ピラゾリネート	10.6	ESI+	439.0	90.8	30	35	439.0	172.9	30	35
フェノキシカルブ	9.4	ESI+	302.1	87.8	20	20	302.1	115.9	20	20
フェリムゾ	7.5	ESI+	255.2	131.9	35	20	255.2	123.9	35	20
フェリムゾ	7.5	ESI+	255.2	131.9	35	20	255.2	123.9	35	20
フェンピロキシメー H	12.1	ESI+	422.2	365.9	25	15	422.2	134.8	25	35
フェンピロキシメー H	13.1	ESI+	422.2	365.9	25	15	422.2	134.8	25	35
ブタフェナシル	8.6	ESI+	494.1	181.5	20	45	492.1	179.5	20	45
フルリド	6.8	ESI+	330.1	309.8	60	30	330.1	258.8	60	45
ヘキサフルムロン	11.3	ESI+	459.0	438.6	20	10	461.0	440.6	20	10
ベンゾフェナップ	11.4	ESI+	431.1	104.8	35	35	433.1	104.8	35	35
ミルベメクチン3	14.0	ESI+	511.3	493.4	20	10	511.3	113.3	20	15
ミルベメクチン4	14.5	ESI+	525.3	507.5	20	10	525.3	109.3	20	25
メチオカルブ	7.4	ESI+	226.1	168.8	20	10	226.1	120.7	20	20
メパニピルム	8.3	ESI+	224.1	105.8	45	25	224.1	77.0	45	40
リニユロン	7.1	ESI+	249.0	159.8	30	20	249.0	181.8	30	20

健康危機管理最前線（その2）

～ヒスタミン中毒発生！スピード検出を実現～

環境局環境科学研究所 苗床江理 森下正人 山口理香 布川 徹 徳崎健史

平成 21 年度 北九州市保健福祉研究発表会

1 はじめに

今年度 9 月に食中毒が市内保育所 3 ヶ所同時発生した。

当研究所に、保健所からアレルギー性食中毒の原因物質であるヒスタミンの測定を依頼され、給食やその食材等の 11 検体が持ち込まれた。

現在のところヒスタミン測定には、公定法は無く、一般的に用いられる HPLC 蛍光測定法は、長時間を要する試験法である。

今回のような食中毒発生時は、迅速に試験する必要性があったため、HPLC 蛍光測定法と同時に、検出器に LC/MS/MS 装置を用いた改善法も試みた。その結果、試験時間の半減化が実現出来、速報値を即日報告が可能となった。本実例をここに報告する。

2 LC/MS/MS 改善法とは

ヒスタミン測定の従来法と改善法のフローを図 1、図 2 に示した。

改善法は、従来法の検出器を HPLC 蛍光から LC/MS/MS に変更したことから、①誘導体化操作の省略と②検出時間の短縮により、試験時間の半減化が実現した。

また、従来法との検出値の比較を表 1 に示した。

未検出 (<5mg/100g) の検体については、両方とも同様で問題はなかった。

その他の検出検体の改善法と従来法の誤差は、400mg/100g レベルでの誤差は-7%であったが、100mg/100g レベルの誤差は-36%であった。

添加回収試験(添加濃度:100mg/100g)の結果は、従来法 100%に対し、改善法は 61%であった。

いずれにしても、改善法の検出値は、従来法よりも低く示す傾向を示した。

但し、従来法は、食品によっては妨害を受け、必ずしも真値を示すとは限らない。

この傾向については、今後、両法の対象食品の選択性やその精製法、及び測定条件などを検証し、解明していかなければならない。

しかしながら、LC/MS/MS 改善法は、食中毒発生時など健康危機管理を目的とした迅速法としては十分有用であった。

表 1 検出値の比較 (単位: mg/100g)

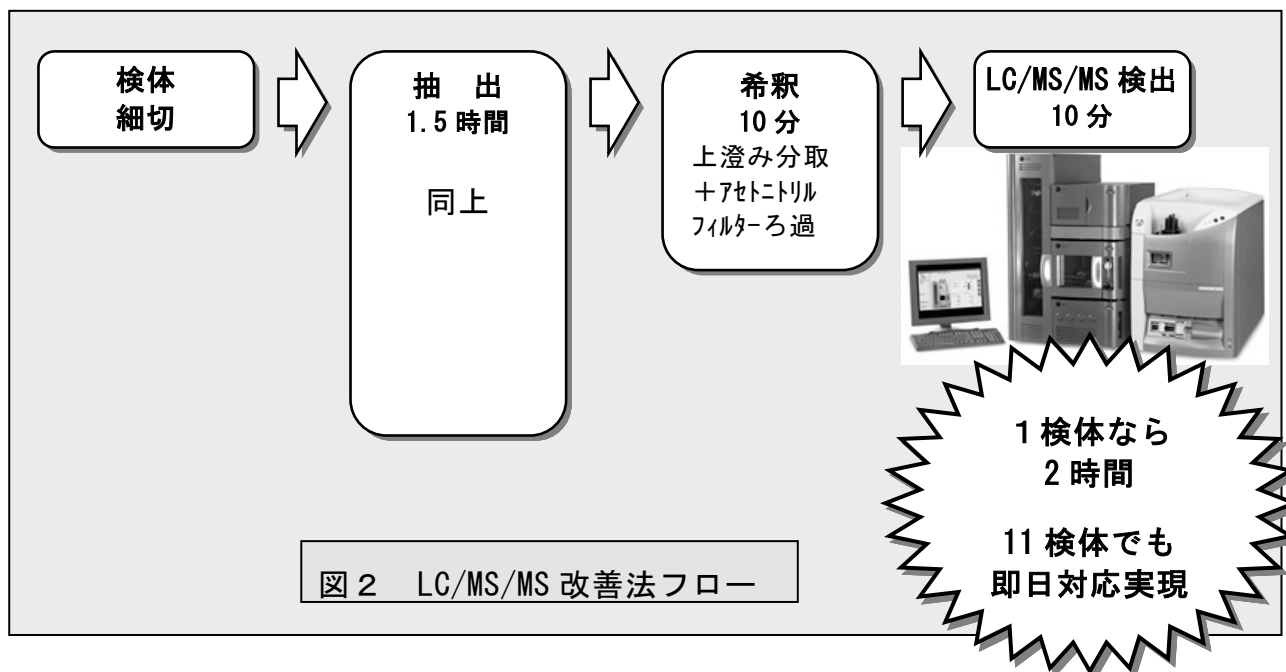
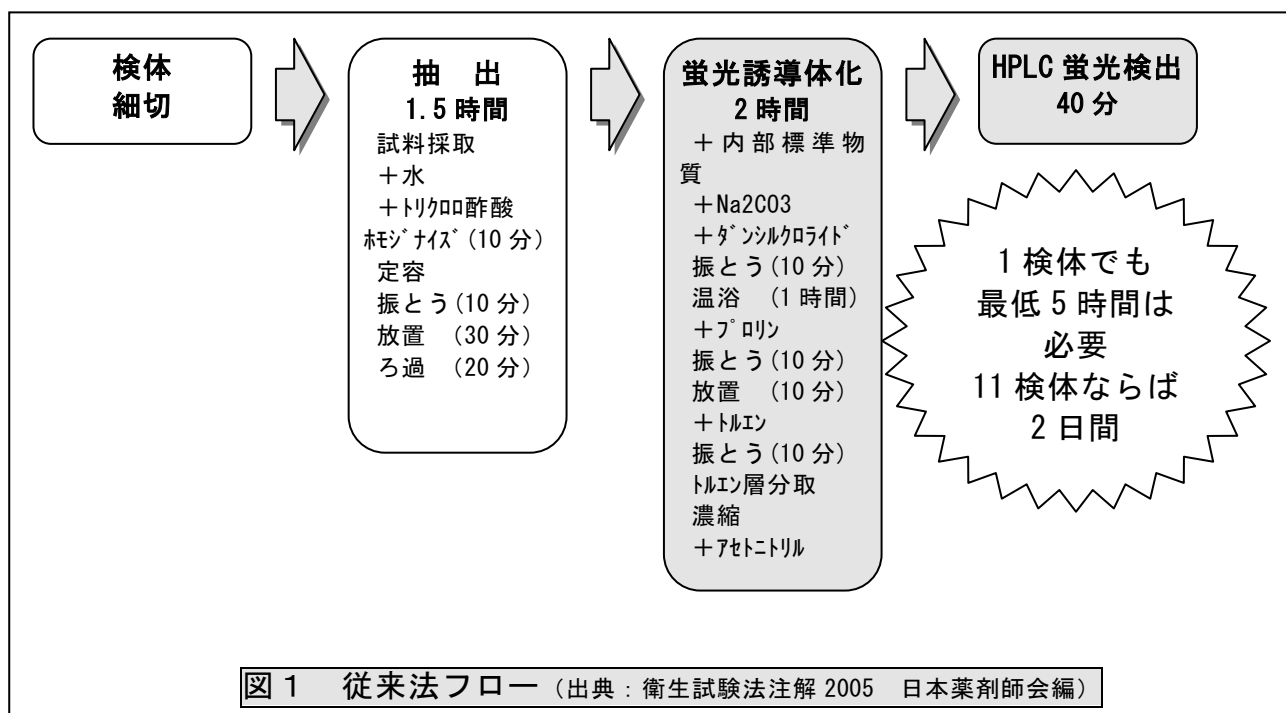
	従来法	改善法	誤差%
A	420	390	-7%
B	110	70	-36%
C	<5	<5	—
D	<5	<5	—
E	<5	<5	—
添加回収試験結果	100%	61%	

3 成果

- ① 検体搬入から速報値報告までの時間の半減化の実現
- ② 時間と試薬、人員の大幅な削減も実現
- ③ 短時間に結果が出るため、操作確認や精度向上が図りやすくなった。

4 今後

本 LC/MS/MS 改善法の精度向上のため、更なる改善を図りたい。
また、その他の食品中の有害物質の試験項目についても、従来法の改善を重ね、健康危機管理体制の更なる充実を図っていきたい。



中国産赤貝から検出された麻痺性貝毒検出事例（第一報）

北九州市環境科学研究所 ○徳崎健史 苗床江理 山口理香 森下正人 布川 徹

第 35 回九州衛生環境技術協議会

平成 21 年 10 月（大分市）

1. はじめに

魚介類の麻痺性貝毒（PSP：Paralytic Shellfish Poison）の有無をモニタリングする目的で、毎年、アサリ、帆立貝等の二枚貝について公定法（マウス毒性試験）により検査を行っている。今年度、アサリ等 5 検体について毒性試験を実施し、中国産赤貝から PSP が検出された。

現在、PSP の毒性成分の分析に関しては、HPLC による分析法が研究されているが、今回、当所で検出された PSP について、その毒性成分をマウス毒性試験の代替検査法として迅速かつ精確に特定する目的で、LC/MS/MS による分析を検討したので、その結果について報告する。

2. 方法

- (1) 試料：赤貝、帆立貝、ハマグリ、アサリ、しじみ
- (2) 標準品：福岡県保健環境研究所より供与された麻痺性貝毒標準品(GTX1-4、C1-2、neoSTX)
- (3) マウス毒性試験溶液の調製：麻痺性貝毒試験は、麻痺性貝毒検査法（厚生省通知）に準拠して実施した。ホモジナイズした試料 100g に 0.1N 塩酸 100ml を加え、pH を 4 以下に調整後よく攪拌し、5 分間水浴中で加温沸騰し室温になるまで放冷した。これを、pH2.0-4.0 に調整し水を加えて 200ml に定容し、攪拌後一昼夜冷蔵庫に放置した。この上澄みを 10ml 取り、3,000rpm、10 分間遠心し、上澄みをマウス毒性試験に使用した。
- (4) LC/MS/MS 測定試験用溶液の調製：麻痺性貝毒試験法に従ってマウス毒性試験用原液を 4ml 取り、OASYS-HLB カートリッジカラム(メタノール 10ml、水 10ml でコンデショニング)で精製し、0.45 μ m 及び 0.2 μ m のディスクフィルターでろ過したろ液を LC/MS/MS 試験溶液とした。
- (5) LC/MS/MS 測定条件
MS/MS：Quattro Premier XE(Waters)
LC：AQUITY UPLC(Waters)
カラム：TSKgel Amide80(東ソー 2.0mm i.d ×250mm、5 μ m)
移動相 A：H₂O、B：95%CH₃CN (A,B は 2mM ギ酸アンモニウム及び 3.6mM ギ酸を含む)
A：B=35:65 流速：0.20ml/min 注入量：5 μ L

表 1. MRM 測定時の条件

	Precursor Ion [m/z]	Product Ion [m/z]	CV [Voltz]	CE [eV]
GTX1, 4	412	332	15	20
GTX2, 3	396	316	45	15
C1, C2	396	316	10	20
neo-STX	316	299	25	25

3. 結果及び考察

(1) マウス毒性試験結果

行政依頼検査として当所に搬入された赤貝、帆立貝、ハマグリ、アサリ、しじみのうち赤貝から 2.1MU の麻痺性貝毒が検出された。

(2) LC/MS/MS 試験結果

以下に各標準品の濃度とその代表的な MRM クロマトグラムを示した。

表 2. 各標準品の濃度

Conc(μ M)	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	C1	C2	neo-STX
	3.34	1.06	0.38	1.17	1.16	0.30	1.51

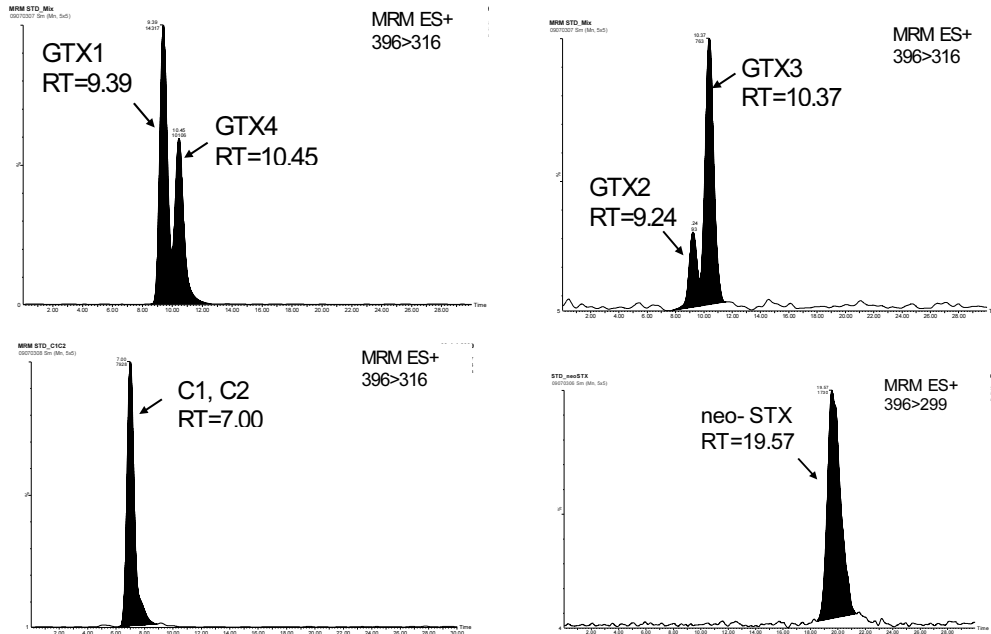
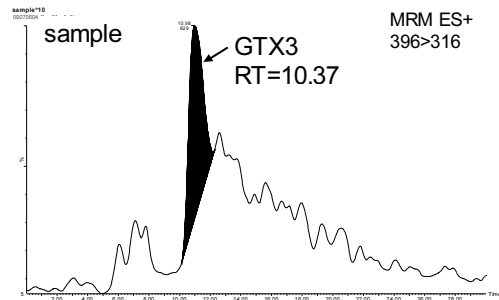


図. 各標準品の MRM クロマトグラム

また、赤貝抽出液はそのままでは測定感度が不足し MRM クロマトグラムが得られなかったため、ロータリーエバポレーターで 10 倍に濃縮したものを測定し、そのクロマトグラムを下に示した。その結果赤貝抽出液中に含まれる貝毒は主に GTX3 で濃度は 0.041μ M であると推定された。

4. まとめ

今回、中国産赤貝から検出された PSP 成分を LC/MS/MS 分析による検討を試みた結果、マウス毒性試験で 2.1MU に相当する PSP 成分に GTX3 が含まれていたことがわかった。また、その濃度は 0.041μ M と推定された。しかし、麻痺性貝毒の標準品は入手不可能なものもあり、また、入手可能な標準品もその容量が少量であるため、分析条件を詰められない等、多々の問題を抱えているのが現状である。また、現在の分析条件では測定感度が悪く、測定値に関しても推測の域を出ないため、今後は更に分析条件を精査し、測定精度の向上を図りたい。



5. 参考文献

- 森田晃祥、山根一城、南條吉之： 鳥取県衛生環境研究所報 第 45 号 2005
- S.J.Sayfritz, J.A.B.Aasen, T.Aune： Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in Norwegian shellfish by liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometry detection, Toxicon 52(2008)330-40