

食品中残留農薬 GC/MS 分析における注入口インサートガラスウールの影響

○陣矢大助¹、岩村幸美¹、石橋正博¹、山口新一¹、花田喜文¹、齊藤 寛¹、門上希和夫²
 (¹北九州市環境科学研究所、²北九州市立大学)

1 はじめに

測定対象物質数の多い食品中残留農薬分析においては、GC/MSやLC/MS/MSを用いた数百成分の多成分同時分析が行われている。このうちGC/MS分析では、一般にガラス(石英)ウールを充填した注入口インサートが採用されている。これは試料中の不揮発性夾雑物による分析カラム汚染を低減し、沸点が異なる対象物質の気化の均一化を促す利点がある。しかし充填材がない場合と比べて試料中の不揮発性夾雑物を蓄積しやすいと考えられ、注入口における対象物質の吸着や分解^{1,2)}、マトリックス効果³⁾等の懸念がある。そこで注入口の状態をチェックするための指標となりうる物質に関する知見を得ることを目的として、石英ウール付及びウール無しの2つの型の注入口インサートについて、これらが食品試料夾雑物によって汚染された場合、どのような物質の定量値に影響するかを検討したので報告する。

2 試験の概要

2.1 対象物質

農薬類77物質及びその他物質139物質計216種(表1)を対象とし、1 µg/mLアセトン標準溶液として用いた。

2.2 食品試料抽出液

玄米、大豆、ほうれんそう、じゃがいも、キャベツ、りんご及びオレンジ各10gを厚生労働省の通知法(GC/MS農産物一斉法)に準じて調製した。

2.3 GC/MS分析

島津製作所GC/MS QP-2010 Plus、注入口250℃、注入口インサート：GLサイエンス製2010スプリットレス用ウール無し及び同2010石英ウール付、注入方法：スプリットレス(1min)、注入量：2µL、キャリアガス：ヘリウム・40cm/s、カラム：Agilent DB-5 ms(長さ30m、内径0.25mm、膜厚0.25µm)、カラム温度：40℃(2min)→(8℃/min)→310℃(5min)、I/F：300℃、イオン源：200℃、四重極：150℃、スキャン範囲：m/z33～600、スキャン速度：0.3s/cycle。定量はPAH類等8種の重水素ラベル化物を用いた内標準法で行った。なお食品試料抽出液の測定は、データ採取以外の測定動作を前出の通知法の条件で行った。

表1 対象物質

	物質群	物質数	物質群	物質数
農薬類	酸アミド系農薬	3	芳香族ケトン	1
	アニリド系農薬	6	脂肪族エステル類	4
	カーバメート系農薬	4	スルホン酸エステル	2
	クロロベンゼン系農薬	2	ベンゼン類	7
	ジニトロアニリン系農薬	3	ビフェニル	1
	ジフェニルエーテル系農薬	3	ハロゲン化ビフェニル	1
	ニトリル系農薬	2	PAH類	14
	有機塩素系農薬	4	ハロゲン化PAH類	1
	有機リン系農薬	1	フェノール類	2
	有機リン系農薬(チオリン酸)	12	アルキルフェノール類	5
	有機リン系農薬(ジチオリン酸)	8	ハロゲン化フェノール類	11
	尿素系農薬	2	アミン類	5
	フタルイミド系農薬	2	芳香族アミン類	9
	ピラゾール系農薬	1	ハロゲン化芳香族アミン類	4
	ピレスロイド系農薬	2	アミノビフェニル類	2
	チアジジン系農薬	1	ハロゲン化アミノビフェニル類	1
	チアゾール系農薬	1	アミノフェノール	1
	チオカーバメート系農薬	5	アミノPAH類	3
	トリアジン系農薬	4	ニトロベンゼン類	6
	トリアゾール系農薬	1	ハロゲン化ニトロベンゼン類	3
その他の農薬	10	ニトロフェノール類	4	
その他物質	n-アルカン類	6	ニトロアニリン類	4
	ハロゲン化炭化水素類	4	ニトロソアミン類	6
	アルコール類	6	複素環式化合物	6
	ハロゲン化アルコール類	2	その他の炭化水素類	1
	エーテル類	4	フタル酸エステル類	6
	芳香族エーテル類	2	リン酸エステル類	4
	ケトン	1	計	216

2.2 インサート比較試験

図1に示す手順で、試料由来夾雑物による装置系内汚染とインサート交換を繰り返し、各操作前後で標準溶液を測定して、各物質の定量値の変化を調べた。

3 結果

216物質のうち交換前1での定量値が初期値の80%未満、80～119%、120～199%及び200%以上となった物質数はそれぞれ、10物質(ベンタゾン、ペンシクロンやペンタクロロフェノール他)、134物質、60物質及び12物質(イソキサチオン、リン酸エステル類他)であった。交換前1～交換後1で定量値が20%以上減少または増加した物質は、それぞれ37物質(チオカーバメート系、有機リン系農薬他)及び26物質(ペンシクロン他)であり、それぞれ定量値が初期値に近づく方向に変化した。交換前2の定量値が初期値の80%未満、80%～119%、120%～199%及び200%以上となった物質は、それぞれ14物質(キャプタホル、メチルダイムロン他)、122物質、65物質及び15物質(ブタミホス、ペンディメタリン、イソキサチオン他)であった。交換前2～交換後2で定量値が20%以上減少または増加した物質は、それぞれ29物質及び13物質(キャプタホル他)であった。多くの定量値は初期値に近づく方向に変化した。メチルダイムロンの定量値は交換前2～交換後2で更に低下した。

注入口インサート内の夾雑物汚染等により検出値が低下するとされるキャプタホル⁴⁾は、ウール無しインサートでは初期値～交換前1で定量値は低下しなかったが、ウール付では交換後1～交換前2の間で定量値が低下するなどの違いが見られた。また、ニトロフェノール類は、石英ウール付インサートの場合にのみ、マトリックス効果によると思われる顕著な定量値増加(交換後1～交換前2)が見られた。

4 まとめ

GC/MS系内が食品試料由来の夾雑物により汚染された場合、注入口インサート内の石英ウールの有無によって、定量値が影響を受ける物質が明らかとなった。

謝辞

GC/MS測定の実施にご協力いただきました(株)島津製作所(京都市)の宮川治彦様、近藤友明様、中川勝博様に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 上水試験法・解説,日本水道協会編,2001.
- 2) 野田ら, 分析化学, 59, 7, p.579, 2010.
- 3) M. Anastassiades, et al., J.Chromatogr A, 1015, p163-184, 2003.
- 4) 小野ら, 第16回環境化学討論会要旨集, p.262, 2007.

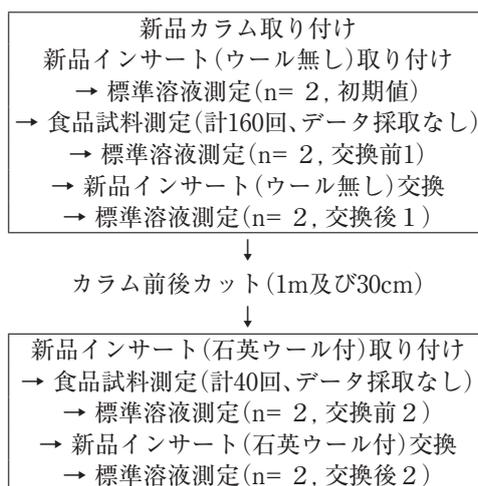


図1 実験操作

ATP法およびLAMP法を用いた浴槽水レジオネラ属菌の簡易迅速スクリーニング法の検討

環境局環境科学研究所 藤田景清・久保田勉・寺西泰司

1 はじめに

レジオネラ感染症は冷却塔水や浴槽水を原因として起こる呼吸器感染症であり、本市においても平成17年度より冷却塔水、翌18年度より浴槽水を検査している。浴槽水は残留塩素濃度0.2ないし0.4ppmと国のレジオネラ対策指針で示されている。しかし本市の過去の検査では高濃度残留塩素の浴槽水からもレジオネラ属生菌が分離されている。しかし、培養法では判定までに一週間以上の日数を要し、施設への迅速な対応を行うには培養法以外の検査法が必要と考えられる。従来、迅速法として遺伝子検査を実施しているが、菌の生死が判別できない欠点があり、最近生菌判別できるEMA法が開発された。また、浴槽水の汚れ具合からレジオネラ属菌の汚染を推測するATP法の活用を国が報告している。しかし、ATP法と遺伝子検査法を併用した事例の報告はなく、今回ATP法およびPCR法に比べて手技が簡易で一時間程度で検体結果を判定できるEMA-LAMP法を用いた併用法の有効性を検討したので報告する。

2 検討方法

平成24年7月から12月に市内公衆浴場から採水された122検体の浴槽水のレジオネラ属菌検査を行った。右図のとおりATP濃度測定後、ろ過濃縮法による100倍濃縮液でレジオネラ属生菌数検査およびLAMP法遺伝子検査を行った。得られた結果から残留塩素濃度、ATP濃度とレジオネラ属菌遺伝子の比較相関について検討した。また分離した菌株性状およびEMA-LAMP法を用いた生菌判別法の有効性についても検討した。

(1) 残留塩素濃度とレジオネラ属菌遺伝子の比較

浴槽水は現地で保健所東西環境衛生係によりDPD法により残留塩素濃度測定後、当所に搬入された。レジオネラ属菌遺伝子の検出はLAMP法により行った。

(2) ATP測定値とレジオネラ属菌遺伝子の比較

食品加工工程のふき取り検査で活用しているATP測定装置 ルミテスター PD-10N (キッコーマン社製)を用いて浴槽水搬入後、直ちに200 μ Lを測定した。ATP値(RLU・相対発光量)は2回測定した平均値を用いた。

(3) LAMP法Tt値(濁度到達時間)とレジオネラ属生菌数の比較

冷凍保存した100倍濃縮液2mlを検体として「Loopampレジオネラ検出キットE」(栄研化学)によりTt値(秒)を測定した。LAMP法は通常、定性試験で利用されているが、遺伝子量が多い場合には、Tt値を定量性に用いることができると考えられている。また、一部検体については2倍時間増幅後、LAMP産物を電気泳動してレジオネラ属菌遺伝子と確定した。

(4) レジオネラ属生菌数および菌種、血清型の比較

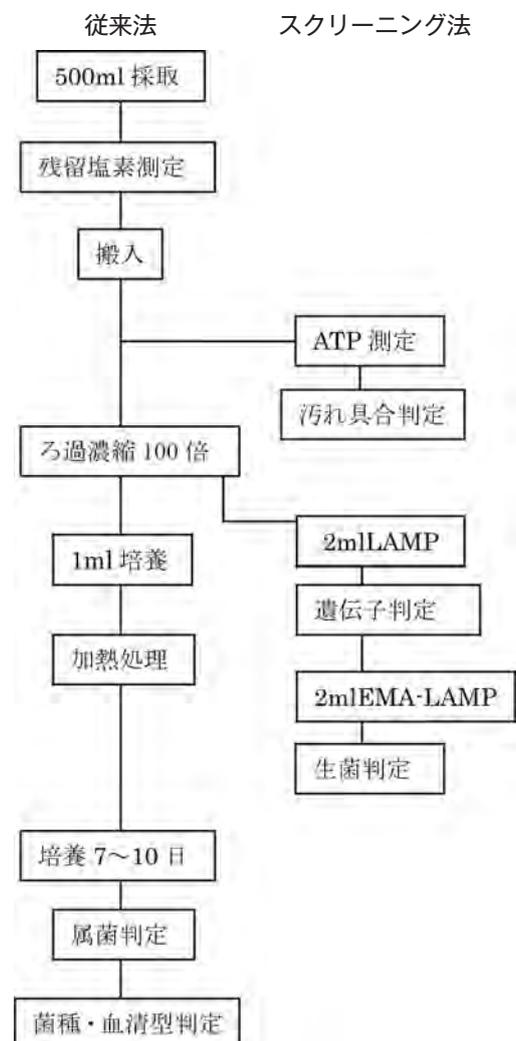
「第3版レジオネラ症防止指針」に記載されたろ過濃縮法・加熱処理法により浴槽水搬入後、直ちに培養検査を行った。

(5) レジオネラ属生菌数とEMA-LAMP法による遺伝子検出の比較

生菌が分離された検体濃縮液を用いて「Viable Legionella Selection Kit for PCR」(タカラ)により生菌に由来するレジオネラ属遺伝子をEMA-LAMP法で検出した。

3 検討結果

浴槽水122検体について検討した結果は、以下のとおりである。



(1) 浴槽水の残留塩素濃度とレジオネラ属菌遺伝子の検出検体数 ()はレジオネラ属菌の生菌検出検体数

	<0.2ppm	0.2 ≤ <0.4	0.4 ≤ <1.0	1.0 ≤
LAMP陽性	18(8)	8(2)	16(10)	11(1)
LAMP陰性	14(0)	6(0)	12(0)	37(0)

(2) 浴槽水のATP濃度とレジオネラ属菌遺伝子の検出検体数 ()はレジオネラ属菌の生菌検出検体数

	<8.0RLU	8.0 ≤ <25.0	25.0 ≤ <50.0	50.0 ≤
LAMP陽性	0(0)	5(0)	8(0)	40(21)
LAMP陰性	18(0)	25(0)	12(0)	14(0)

(3) LAMP法Tt値とレジオネラ属生菌数の相関

培養法で陽性となった21検体は、すべてLAMP法陽性であった。また、LAMP法Tt値とレジオネラ属生菌数の相関は認められなかった。LAMP法陽性検体53検体はTt値798～3546秒、培養法陽性検体21検体はTt値798秒(35cfu/100ml)～3366秒(30cfu/100ml)であった。最大生菌数6600cfu/100mlのTt値は1974秒であった。

(4) 分離菌株の詳細

施設	1回目		2回目		3回目			4回目		
	菌数	菌種血清型	菌数	菌種血清型	菌数	菌種血清型	EMA-LAMP	菌数	菌種血清型	EMA-LAMP
A1	35	L.p UT	10	L.p UT	0			220	L.p UT/6	+
A2	880	L.p UT/6	35	L.p UT/6	0			40	L.p UT/1/6	+
A3	0				10	L.p 6	-			
A4	0		0		160	L.p 6	-	330	L.p 6	+
B	15	L.p UT/3	70	L.p UT/3						
C1	20	L.p UT/1/5	10	L.p 5						
C2	60	L.p 5	0							
D	30	L.p 1	0							
E					140	L.p 5/6	-	6600	L.p 5/6	+
F1					50	L.p 3	+			
F2					30	L.p 3	+	0		
G					0			10	L.p 6	-
H					0			10	L.p 1/5	-

L.p : Legionella pneumophila 菌数はcfu/100ml を示す。

(5) レジオネラ属生菌数とEMA-LAMP法によるレジオネラ属生菌遺伝子の比較

3回目・4回目の培養法陽性の11検体を用いてEMA-LAMP法を実施した結果は、6検体が陽性となった(陽性判定率56%)。EMA-LAMP法にて陰性と誤って判定した検体の生菌数は10～160cfu/100ml、陽性と正しく判定した検体の生菌数は30～6600cfu/100mlであった。

4 考察

検討結果から、レジオネラ属菌は残留塩素濃度で指針とされている0.4ppm以上でも今回検出された。過去の事例同様に残留塩素濃度を指標としたスクリーニングは困難であると考えられた。また、浴槽水のATP濃度は遺伝子や生菌と相関が認められスクリーニングに適用できると考えられた。今回の結果ではATP濃度50RLU未満では生菌が分離されず、レジオネラ属菌の生死は50RLUを基準とすることができた。50RLUは厚生労働省の報告でも基準とされており、今回の検査でも再現性が確認された。LAMP法Tt値とレジオネラ属生菌数の相関については、比較的生菌数の多い場合は相関が認められると定量性の可能性を報告しているが、今回は菌株分離検体の生菌数のばらつきが大きく相関は認められなかった。原因としてLAMP法阻害物質の影響によるTt値のばらつきの可能性もあり、今後反応阻害防止剤の活用も必要と考えられた。通常LAMP法では3600秒を増幅時間としているが、今回LAMP法陰性・培養法陽性検体について2倍増幅時間で行ったところLAMP法の結果が陽転した。今後LAMP法を実施する場合、陰性検体でも増幅時間の延長を考慮する必要があると考えられた。EMA-LAMP法による生菌の遺伝子確認は今回54%の検出に留まったが、今後さらに検体数を増やし精度の向上に努めたい。

今回ATP・LAMP併用法を用いたレジオネラ属菌のスクリーニングを検討した。LAMP法は検体搬入当日に生菌の存在を確定することで迅速な対応をとることができ、またATP法を用いて浴槽水の汚れを把握することはレジオネラ属菌の繁殖しやすい環境を現場で確認できスクリーニングには有効と考えられた。

最後に、ATP測定装置を貸与していただきました北九州市食品衛生協会に謝辞を申し上げます。

報 告 書



洞海湾における水質の改善と付着動物の出現状況
(三井物産環境基金2009年度研究助成最終報告書)
平成25年3月

三井物産環境基金2009年度研究助成を受け、平成22年(2010)度から3年間、本市洞海湾における付着動物の分布状況及び水質環境の調査を実施し、付着動物組成の変化から環境の回復を評価した。

洞海湾はかつて深刻な水質汚濁により生物がすめない「死の海」と呼ばれていたが、法整備や水質浄化対策により水質改善が進み、平成元年度から5年度にかけて実施した洞海湾総合調査では、付着動物74種、魚介類115種など多くの水生生物の回復が確認された。当時はまだ窒素・リン濃度が高く富栄養化した状態であったが、平成9年に窒素・リンに係る環境基準が設定され、さらに水質改善が進んだことから、生態系が変化していることが推察された。

そこで、一生のほとんどを岸壁や岩礁などに固着して生活するため水質環境の変化の指標となりやすい付着動物に着目し、生物組成の変化から洞海湾の水質改善状況を調査した。

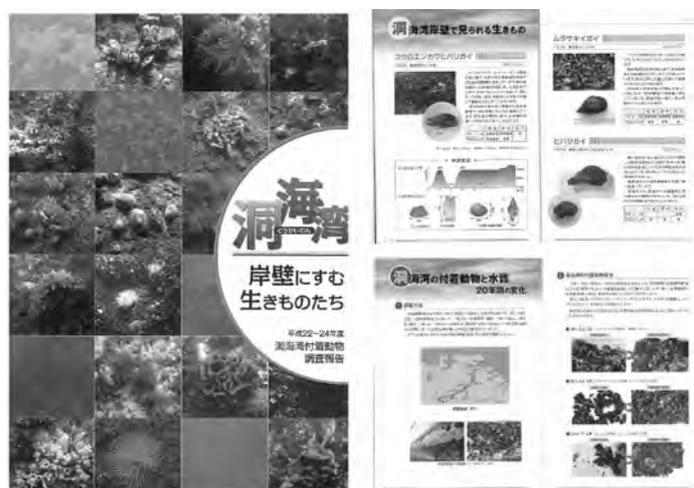
調査は、季節ごとに、湾内5地点の深度3層について付着動物の生息状況や水質を調べるもので、洞海湾総合調査結果との比較を行った。

水質は全地点で改善されており、特に溶存酸素や、窒素・リンの顕著な改善が確認された。夏季に湾央よりも湾奥側で見られていた貧酸素状態が、今回は確認されなかった。

湾全体で118種の付着動物が確認され、全地点で大きく増加していた。ムラサキイガイやマガキ、コウロエンカワヒバリガイなど圧倒的に優占していた二枚貝が激減し、湾口部のみで確認されていたカイメンなどが湾奥でも確認されるなど、特定の種に独占されていた状況から、種類数の増加や均衡性の高まりなど、より健全な生物分布への変化が確認された。これらは、水質改善が大きく影響しているものと考えられる。

洞海湾～岸壁にすむ生きものたち
(平成22～24年度洞海湾付着動物調査報告小冊子)
平成25年3月

平成22～24年度に行った洞海湾付着動物調査の結果について、一般の方にも分かりやすいように多数の写真を掲載した小冊子にまとめ、希望する市民へ配布するとともに市内学校や図書館、環境教育施設へ寄贈した。



小冊子表紙(左)及び写真を多用したページの例(右上下)

論 文



Comprehensive Analytical Method for Semi-volatile Organic Compounds in Water Samples by
Combination of Disk-type Solid-phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry
Database System

Daisuke Jinya *, Tomomi Iwamura * and Kiwao Kadokami **

* Kitakyushu City Institute of Environmental Sciences

** Faculty of Environmental Engineering, University of Kitakyushu

Analytical Sciences, Vol.29, 2013, p.483-486

Abstract

A disk-type solid-phase extraction method for simultaneous extraction of a wide range of semi-volatile organic compounds in water samples was developed. The developed method could extract 186 out of 202 model compounds from spiked environmental samples (0.1 µg/L) with 94% average recovery (50 – 111%). Compared with the previous cartridge-type method, the extraction time was reduced to approximately 1/6. Applying the combination of the developed method and the database system to environmental samples for non-target analyses, 39 micro-pollutants with a wide range of physicochemical properties were determined.

(Received December 14, 2012; Accepted January 29, 2013)