

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

食品中に残留するマイコトキシン分析に関する精度管理体制の構築に関する研究

主任研究者	小島 幸一	(一財)食品薬品安全センター
分担研究者	斉藤 貢一	星薬科大学 薬品分析化学教室
協力研究者	岩崎 雄介	星薬科大学 薬品分析化学教室
	伊藤 里恵	星薬科大学 薬品分析化学教室
	加藤 美穂子	(株)フロンティア研究所
	石井 里枝	埼玉県衛生研究所 水・食品担当
	黒川 千恵子	さいたま市健康科学研究センター 生活科学課
	高橋 美津子	横浜市衛生研究所 検査研究課 薬事室
	堀井 裕子	富山県衛生研究所 化学部
	寺田 久屋	名古屋市衛生研究所 食品部
	谷口 賢	名古屋市衛生研究所 食品部

研究要旨

食品汚染カビ毒（マイコトキシン）の一種であるデオキシニバレノール(DON)について、本分担研究ではビール中 DON に着目し、食品流通過程などフィールドでの迅速な DON 分析への活用が期待される市販 ELISA キットを用いて、外部精度管理試験を行った。

食品試料としてビールを選定し、試料前処理法としてアセトニトリル抽出と、多機能カラム MycoSep®#227 を用いてクリーンアップした。ELISA については、市販キットの中でも高感度タイプの RIDA スクリーン FAST DON (r-Biopharm 社製)を用いた。

その結果、DON 標準品を用いた ELISA の IC_{50} 値は、外部精度管理試験に参加した 7 機関とも $Mean \pm 2SD$ 以内であり、良好な感度と再現性が得られた。高濃度添加試料(100 ppb)の室間再現精度については、前処理の有無に関わらず、7 機関とも $Mean \pm 2SD$ 以内であり、更に、添加濃度に対する平均値(最確値)との隔たりも比較的小さく、スクリーニング法としてほぼ満足できる結果が得られた。他方、低濃度添加試料(10 ppb)においては、7 機関とも $Mean \pm 2SD$ 以内であったが、最確値からの隔たり(残渣)のばらつきは大きく、添加濃度からの乖離も大きくなった。しかし、前処理操作を行うことで、DON 濃度が 10 ppb 以上の試料中であれば ELISA での測定が可能であることが示唆された。

A. 研究目的

デオキシニバレノール(DON)は、赤かび病菌として知られるフザリウム属真菌が産生するかび毒(マイコトキシン)であり、主に穀類(麦類、米、トウモロコシ等)を汚染することが知られている。

物性として、DONを含むトリコテセン類のマイコトキシンは熱安定性が高く、120℃で安定、180℃でやや安定、210℃では30~40分で分解する。製粉により、通常、ふすまに高く、小麦粉には低く含有される。調理過程として麺類およびスパゲッティの調理中にゆで汁に相当量移行する。また、パンの発酵・焼成過程で概ね半分に減衰するが、酵母による分解はないとされている。従って、通常の調理過程ではあまり減毒されないと考えられる。動物実験におけるDONの急性毒性として、吐き気、嘔吐、下痢、腹痛、食欲減退、めまい、頭痛および発熱等が知られている。他方、慢性毒性としては、免疫機能の抑制などが報告されている。

わが国では小麦に残留するDONの暫定的な基準値として1.1 mg/kgが定められている。この基準値は、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会合で定められた暫定的最大耐容一日摂取量および国民栄養調査による小麦類の1人当たり一日摂取量に基づき、小麦から小麦粉へのDONの減衰を考慮した科学的知見に基づいて定められたものである。

農林水産省の調査において、大麦を原料とした加工食品であるビールから微量ではあるがDONが検出されており、「国民栄養調査報告」では、ビールの一日当たりの摂取量が58.6 g/日であることが示されているが、ビール趣向のある人の実際の摂取量は、この値をはるかに超えていると推察さ

れる。そのため、このようなケースではヒトへのDON曝露量も多くなり、JECFAで設定されている暫定耐容一日摂取量(1 μ g/kg bw/day)を超えることが懸念された。しかしながら、現在のところ、大麦やビールなどの加工食品についてDONの残留基準値は設けられていない。

そこで本分担研究ではビール中DONに着目し、流通過程などフィールドでの迅速なDON分析への活用が期待される市販ELISAキットの有用性を検証することとした。昨年度までの本分担研究において、試料中DON濃度100 ng/mL(小麦の暫定的な基準値の約1/10)において、ELISAは検出感度(検出限界)、検量線の直線性および IC_{50} 値において食品分析法として十分な性能を有していることが示された。しかし、ビール中に残留するDONのレベルは極めて微量であり、低濃度の実試料分析に際しては、マトリックス由来の影響を受けることが懸念されたため、市販ELISAキットを活用してより高感度測定を可能とするために、試料前処理法について検討し、併行再現性および室内再現性実験を行い、良好な結果を得た。

そこで本年度の研究では、構築した前処理法とELISAについて室間再現精度を確認するために外部精度管理試験を行うこととした。本研究は、DONについての規制値や対象食品見直しのための提言を行うため、その基礎データとなる精度管理の整備に寄与することを目的とするものである。

B. 研究方法

(1) DON測定用ELISA

ELISAには、市販キット『RIDASCREEN® DON』(R-Biopharm社製)を用いた。ELISAキ

ットの測定原理は、抗 DON モノクローナル抗体を用いた直接競合法である。概略は以下の通りである。抗マウス IgG 捕捉抗体が固定化された 96 穴ウェルプレートに、DON 標準品(または検体)、次に HRP 標識 DON を加え、最後に抗 DON 抗体を順次加えて競合反応させる。得られた HRP-DON-抗体複合体の酵素(HRP)活性を測定することにより、検体中の DON 濃度を求める。

実際の使用方法はキット付属の取扱説明書に準じて行った。なお、キットに付属の標準液の最低濃度は、本実験に適用するには不十分であったことから、更に低濃度(1.23 ng/mL)を別途調製し、ELISA キットに添付した。

吸光度の測定については、各検査機関で日常的に使用しているプレートリーダーを用いることとし、データ処理についても、測定装置付属のデータ処理ソフトを用いて行うこととした。

(2) 外部精度管理試験

室間再現精度を評価するために、市販のビールに DON を添加した精度管理用標準試料を作製した。DON 添加濃度は高濃度試料(100 ng/mL) および低濃度試料(10 ng/mL) とし、外部精度管理試験に参加する検査機関には濃度を伏せた状態で(サンプル A およびサンプル B として)送付した。また、抽出・クリーンアップ操作は指定の方法(下記(3))とし、実験に必要なクリーンアップ用多機能カラム MycoSep®#227 およびハイフろスーパーセルも ELISA キットおよび標準試料と共に各検査機関に配布した。

(3) 抽出・クリーンアップ操作

ビール 10 mL にハイフろスーパーセル 2 g、アセトニトリル 40 mL を加え、1 時間混合す

る。その後、減圧ろ過を行い、ろ液を濃縮乾固する。アセトニトリルと水の混合溶液(84 : 16) 10 mL で残留物を再溶解し、クリーンアップ用多機能カラム MycoSep®#227 を用いて精製し、ELISA 用の試験溶液とする(図 1)。

なお、前処理による試料精製の有無による ELISA 測定への影響を調べるために、上記の前処理を行わずに、試料を水で希釈したものを直接 ELISA で測定する実験も並行して行うこととした。

C. D. 研究結果および考察

(1) DON 標準品を用いた ELISA の IC₅₀ 値の比較

DON 標準品による検量線(シグモイド曲線)から IC₅₀ 値を算出し、検査機関間で比較することで、ELISA キットの性能と実験者の技術レベルを評価した。代表的な検量線を図 2 に示した。キット付属の標準液に新たに加えた低濃度標準液(1.23 ng/mL)はシグモイド曲線の直線領域(3.7~33.3 ng/mL)からは外れるものの、4 パラメータ・ロジスティック・モデルで解析した回帰曲線上にほぼ該当していたことから、この濃度付近においても定量計算は可能であると思われた。

参加した 7 検査機関間の IC₅₀ 値の比較データを図 3 に示した。平均値は 16.4 ng/mL であり、7 検査機関中 5 機関が標準偏差(SD: 3.5 ng/mL)以内(|z-Score| < 1)に、また残りの 2 機関の値も標準偏差の 2 倍以内(|z-Score| < 2)に収まっていたことから、用いた ELISA キットの性能に問題は無く、また、各検査機関において本実験に従事した実験者の技術レベルにも問題がないこと

が確認された。

(2) 高濃度添加試料の精度管理結果

高濃度添加試料(100 ppb)の室間再現精度については、指定の前処理を行った場合、いずれの検査機関のデータも添加濃度より若干低めではあったが、添加濃度と平均値(最確値)との乖離は20%未満であり、また残差の z-Score は全て $|z| < 2$ の範囲に収まっていたことから、室間再現精度実験として信頼性の高い満足できる結果が得られた(図4(A))。なお、測定値が添加濃度より低目となったのは、前処理としてアセトニトリル抽出および MycoSep[®]227 による精製工程が加わったため、操作過程での損失があったものと推察された。

他方、前処理を行わなかった場合、添加濃度と最確値との乖離は10%程度と良好な結果が得られ、7検査機関中5機関の測定残差(z-Score)は、 $|z| < 1$ であった(図4(B))。残りの2機関も若干高めではあったが、 $|z| < 2$ の範囲に収まっており、スクリーニング法としてほぼ満足できる結果が得られた。したがって、ビール中にDONが高濃度(100 ppb)で汚染されている場合には、試料精製を行うことなく水で希釈する処理のみで信頼性の高いELISA測定を行えることが示唆された。

(3) 低濃度添加試料の精度管理結果

低濃度添加試料(10 ppb)の室間再現精度については、前処理を行った場合、上記(2)の高濃度添加の結果と同様に、7機関中5機関は測定残差が $|z| < 1$ 、残りの2機関も $|z| < 2$ の範囲に収まっていた。しかし、添加濃度と最確値との乖離は80%程度と比較的大きく、7検査機関中でのばらつきも最大値/最小値で約3倍の開きが認められた(図

5(A))。

他方、“前処理なし”の測定結果はいずれの検査機関も $|z| < 2$ の範囲に収まっていたが、添加濃度と最確値との乖離は約200%と大きくなった(図5(B))。これら低濃度添加試料において測定精度が低下した理由として、添加レベルは用いたELISAキットの検量線範囲内ではあったが、マトリックス由来の“擬陽性”となる夾雑物の影響を受けたことが推察された。これは“前処理あり”の方が“前処理なし”に比べて添加濃度と最確値との乖離が比較的小さいこと、また、最確値そのものも、“前処理なし”と“前処理なし”との比が2倍に近い値が示されたことから裏付けられると推察された。

なお、外部精度管理用試料の作製に用いたもとのビールに、ブランクとしてDONが混入していたことも考えられたが、高濃度および低濃度添加試料をそれぞれ別途にGC/MSおよびLC/MS/MSを用いてDON濃度を測定したところ、いずれも添加濃度 $\pm 10\%$ 程度の値が得られたことから、ブランク中のDON濃度による影響はほとんどなかったものと判断した。

以上の結果から、低濃度試料では精度が低下したものの、前処理操作を行うことで、DON濃度が10 ppb以上のビール試料であれば、ELISAでのスクリーニングが可能であることが示唆された。

E. 結論

本研究は、DON汚染が危惧される食品として、従来的小麦類に加えて大麦製品であるビールに着目し、フィールドでの迅速な検査を行うためのELISAの実用性について検

証した。その結果、市販の ELISA キットを用いることでビール中 DON のスクリーニングとして十分に適用可能であった。本研究を遂行することによって、国産製品はもとより、輸入食品など市場に流通する食品の安全性評価や、今後の規制値導入の検討に際して重要な情報を提供することに大いに寄与することが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(1)高橋拓海、岩崎雄介、伊藤里恵、斉藤貢一;ELISA および GC/MS 法によるビール中に残留するデオキシニバレノール分析法の検討：第 57 回 日本薬学会関東支部大会，東京，2013

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

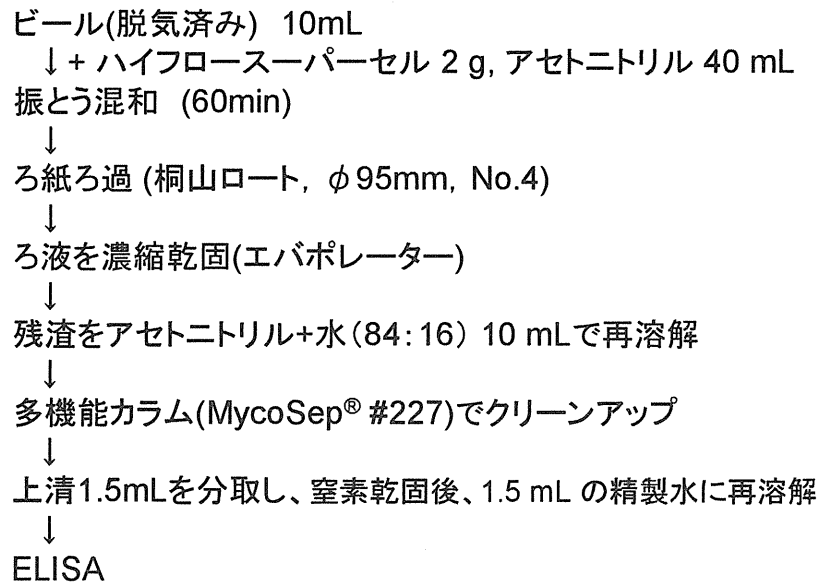


図1 ビール中 DON 分析の試料前処理法のフローチャート

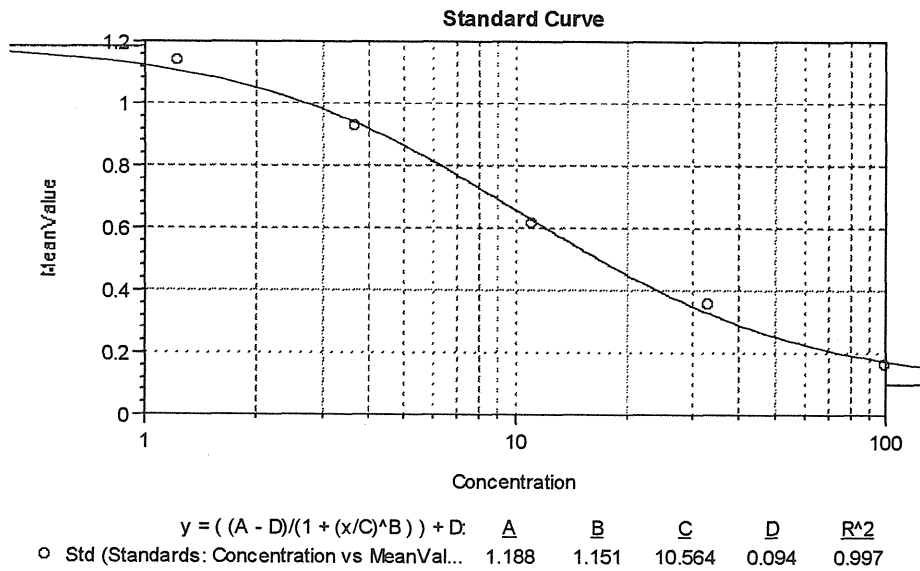


図2 代表的な ELISA の検量線
(4パラメータ・ロジスティック・モデル)

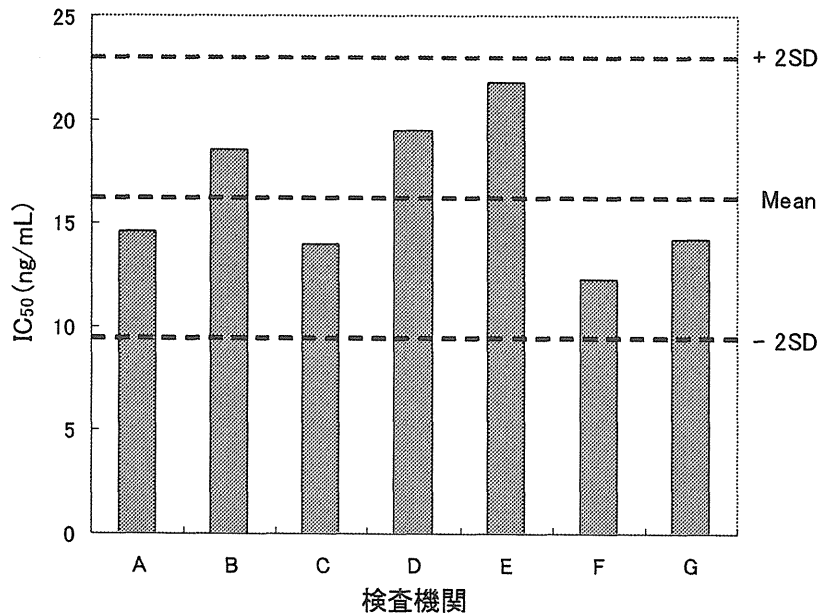


図3 検査機関間の IC₅₀ 値の比較

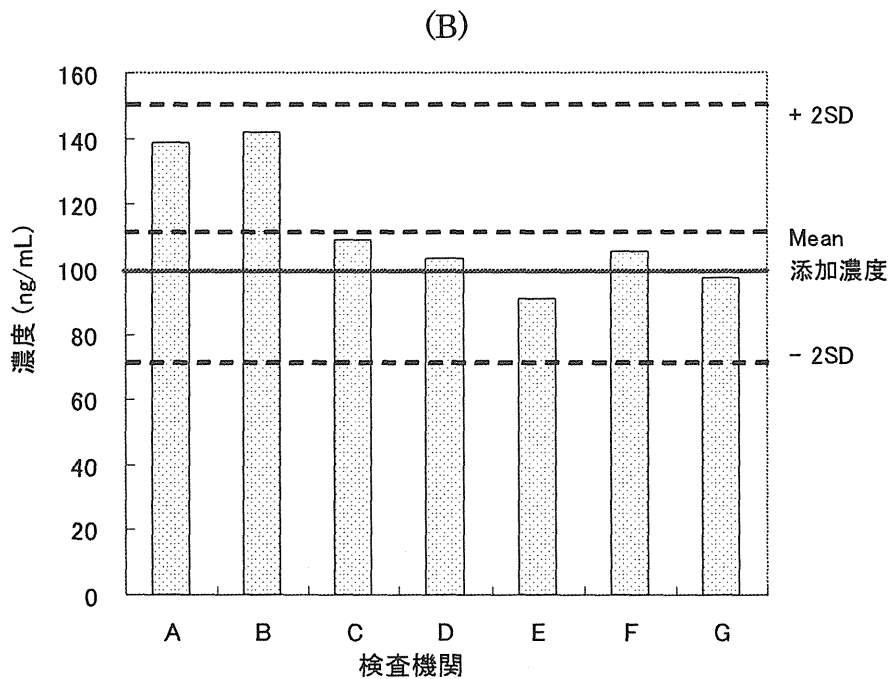
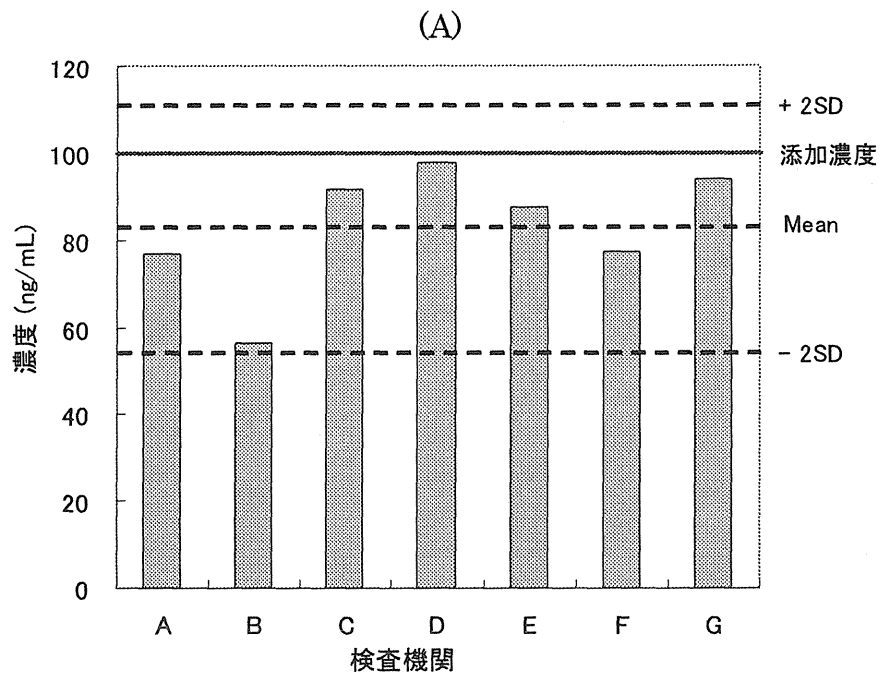


図4 高濃度添加試料(100ppb)の空間再現精度結果
 (A) 前処理あり, (B) 前処理なし

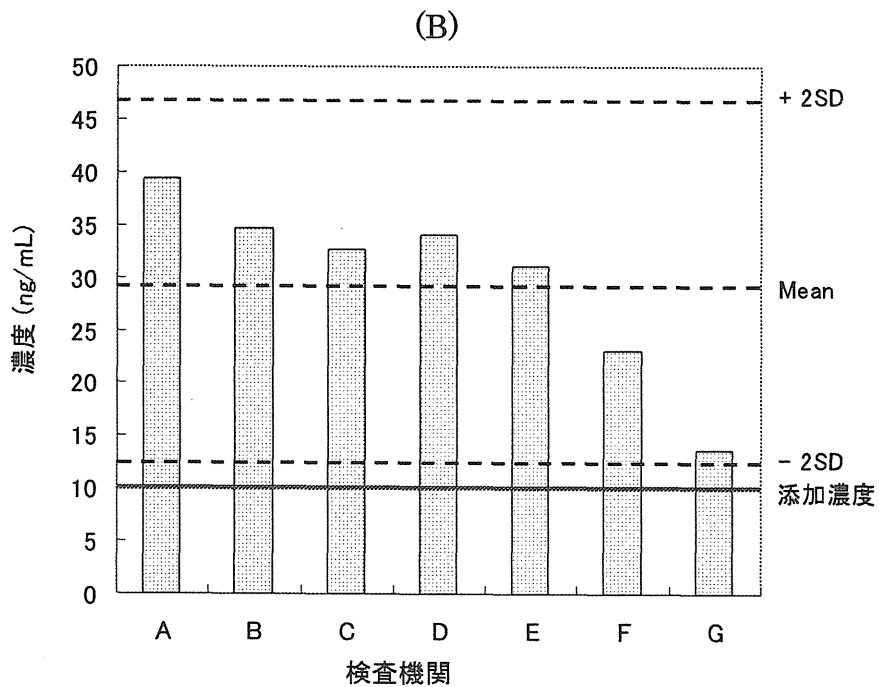
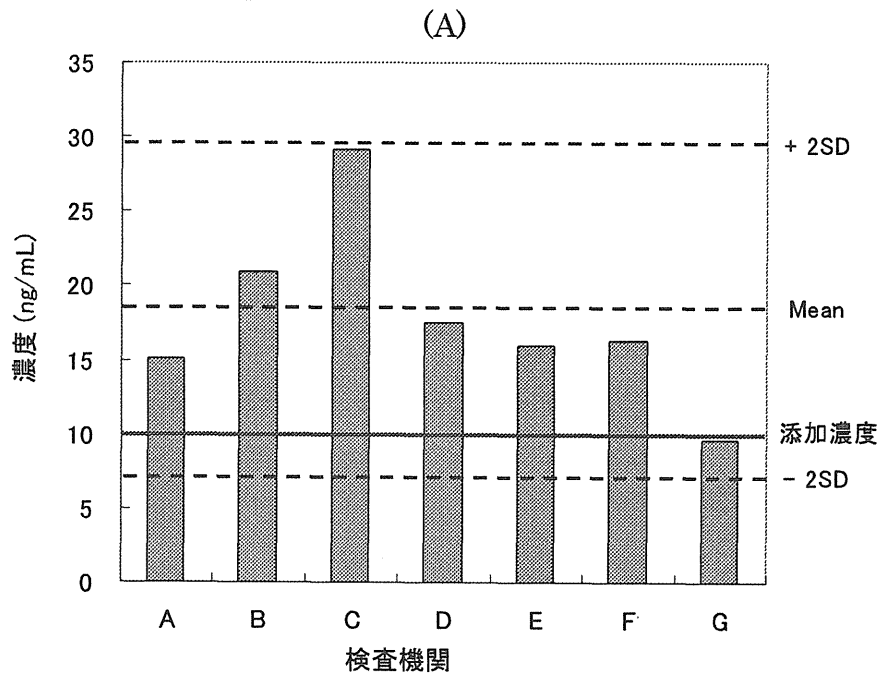


図5 低濃度添加試料(10ppb)の室間再現精度結果
 (A) 前処理あり, (B) 前処理なし

厚生労働科学研究費補助金(食品の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 25 年度 分担研究報告書

食品中の残留農薬等試験検査におけるマトリックスの

影響評価に関する研究

分担研究者 村山 三徳

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告

—食品中の残留農薬等試験検査におけるマトリックスの影響評価に関する研究—

主任研究者 小島幸一 (一財)食品薬品安全センター 所長
分担研究者 村山三徳 (公社)食品衛生協会食品衛生研究所 課長
協力研究者 伊藤禎啓 (公社)食品衛生協会食品衛生研究所
吉田裕一 (公社)食品衛生協会食品衛生研究所

研究要旨

食品中の残留農薬等試験検査においては、ガスクロマトグラフ質量分析計、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた試験検査方法が汎用されている。質量分析計を検出器として用いた方法は、検出可能な化合物が多いうえに選択性が高いことから、様々な試験検査の場において応用が広がっているが、検体由来のマトリックスの影響を受けやすく、測定値の安定性が従来の検出器より劣る欠点がある。本研究では、クロマトグラフィーの質量分析計におけるマトリックス効果の軽減をはかり、検査機関の信頼性確保に寄与する事を目的とした。

1. 食品成分等の常在化合物によるマトリックス効果の評価

各種クロマトグラフ質量分析計を用いた試験検査方法において、マトリックスは検体の種類により異なり、試験検査の抽出、精製方法により異なる。マトリックス効果を補正するにはマトリックス標準を用いる方法が一般的であるが、その具体的手法についての研究は十分でない。本研究では、昨年度に続き、食品中の残留農薬、食品添加物等の各種クロマトグラフ質量分析計を用いた試験検査において、絶対検量線法、マトリックス検量線法、試験溶液への標準溶液添加法を比較した結果、マトリックス効果の補正方法としては、試験溶液への標準溶液添加法が優れている結果が得られた。

2. 添加物等の人為的化合物の試験検査に及ぼす影響の評価

食品添加物の中には酸化剤、抗酸化剤等反応性が高い化合物がある。一方、残留農薬等にも反応性が高い化合物があり、食品中の添加物と反応することが予想される。残留農薬等試験検査においては、添加回収試験を実施して試験検査操作の正当性を確認しているが、同一種類の検体においても回収率に明らかな差がある等、添加物の影響が疑われる場合がある。本研究では、食品添加物と農薬等の反応性を検証した。

A. 研究目的

わが国における、食の安全・安心施策を推進するため、厚生労働省は、平成18年度に、ポジティブリスト制度を導入し、800種類を超える農薬等に残留基準を設定した。また、検疫所並びに登録検査機関においては、海外から輸入される食品中の残留農薬レベルについてのモニタリング検査や輸入検査の実施を、また、地方自治体の衛生研究所等においては、国内市場の食品についての収去検査等の実施を、食の安全確保のリスク管理施策の一環として実施している。これらの検査の中でも、特に、輸入食品検査においては、違反の判定結果の精度の不確かさが2国間での貿易上の摩擦を生じさせる危険性があることから、輸入食品検査に用いる検査法については、その精確さが厳しく求められている。

ポジティブリスト制度以来、増大する残留農薬等試験検査に対応するために、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)、液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)を用いた方法が多用されるようになってきた。質量分析計を検出器として用いた方法は、その選択性の高さから定性方法として汎用されるのみならず、多成分一斉分析等では定量にも欠かせない検出方法となっている。しかしながら、質量分析計は検体由来のマトリックスの影響を受けやすく、測定値の安定性が従来の検出器より劣る欠点がある。質量分析計は測定対象化合物をイオン化して、その質量数に応じて電磁氣的に分別して測定する手法であるが、イオン化の段階で共存するマトリックスにより測定対象化合物のイオン化が増進あるいは抑制される現象が起きる。また、イオン化後の電磁氣

的分別の段階においても、共存マトリックスによる飽和、二次衝突等により影響を受けることが知られている。

質量分析計におけるマトリックスの影響を軽減するためには、抽出、精製の段階において測定対象化合物以外のマトリックスを極力排除することが基本であるが、多成分一斉分析において化学的性質の異なる測定対象化合物を他のマトリックスから選択的に分別回収することは困難である。また、適正な安定同位体をサロゲートとして用いる方法は、マトリックス効果の補正のみならず、抽出、精製における回収率の補正にも有効であり、質量分析計を検出器として用いる分析では最良の方法であるが、すべての測定対象化合物に最適な安定同位体が準備されてはいない。

質量分析計におけるマトリックスの影響を軽減するために、現状で一般的に行われている方法はマトリックス標準による補正である。検体由来のマトリックスに標準品を加えることにより、マトリックスの影響の度合いを測り、検体中の測定対象化合物の測定値を補正することを目的とする。具体的な手法としては、抽出、精製操作を繰り返してマトリックス溶液を集め、標準溶液をマトリックス溶液で希釈して標準検量線を作成する方法(マトリックス検量線法)、検体に標準溶液を添加して抽出、精製操作を行う方法(標準添加法)、抽出、精製操作を行い得られた試験溶液に標準溶液を添加、希釈する方法(標準希釈法)等がある。マトリックス検量線法は、一定のマトリックスが安定して得られる試験法に有効な手法である。標準添加法は、抽出、精製における測定対象化合物の回収率の補正にも有効

であるが、抽出、精製操作および測定が 2 回分以上になる。標準希釈法は、抽出、精製操作は簡便であるが、測定は 2 回分以上になる。これらのマトリックス効果補正方法は、経験的に使い分けられており、補正方法の選択の目安は明確にされていない。

本研究では、残留農薬、食品添加物等の各種クロマトグラフ質量分析計を用いた試験検査における各種マトリックス効果補正方法の特性を調査し、補正効果の最適化を図り、検査機関の信頼性確保に寄与する事を目的とした。

また、残留農薬等試験検査における、食品添加物の影響についても検討した。食品添加物の中には酸化剤、抗酸化剤等反応性が高い化合物がある。一方、残留農薬等にも反応性が高い化合物があり、食品中の添加物と反応することが予想される。残留農薬等試験検査においては、添加回収試験を実施して試験検査操作の正当性を確認しているが、同一種類の検体においても回収率に明らかな差がある等、添加物の影響が疑われる場合がある。魚介類のマラカイトグリーン (MG) およびロイコマラカイトグリーン (LMG) の試験において、同一種類の魚介類の検体であっても添加回収がとれる検体ととれない検体が存在する。魚介類に対して殺菌等の目的で二酸化硫黄、過酸化水素等の食品添加物を使用している例があることから、MG および LMG への食品添加物の影響を調査した。

B. 研究方法

1. GC/MS によるクロルピリホス、フルトラニル、マラチオンの定量

1-1) 試料

にんじん、ほうれんそう (測定対象農薬が残留していないことを確認して用いた。)

1-2) 試薬

- ・クロルピリホス (98.5%、Dr. Ehrenstorfer 製)
- ・フルトラニル (99.5%、Dr. Ehrenstorfer 製)
- ・マラチオン (99.0%、Dr. Ehrenstorfer 製)

1-3) 装置および測定条件

1-3-1) GC/MS による農薬等の一斉試験法 (農産物)、厚生労働省通知法

- ・ガスクロマトグラフ質量分析計
ガスクロマトグラフ : GC-2010 (島津製作所製)
質量分析計 : GCMS-QP2010Plus (島津製作所製)
- ・カラム : DB-5MS, 0.25 mm ϕ \times 30 m, 膜厚 0.25 μ m (Agilent J&W 製)
- ・カラム温度 : 50 $^{\circ}$ C (1 分) $-$ 25 $^{\circ}$ C/分 $-$ 125 $^{\circ}$ C (0 分) $-$ 10 $^{\circ}$ C/分 $-$ 300 $^{\circ}$ C (10 分)
- ・注入口温度 : 250 $^{\circ}$ C
- ・注入方式 : スプリットレス
- ・キャリアーガス : ヘリウム
- ・インターフェース温度 : 300 $^{\circ}$ C
- ・イオン化モード : EI
- ・測定モード : SIM
- ・測定イオン (m/z, 定量イオン, {確認イオン}) :
クロルピリホス ; 314, {197}
フルトラニル ; 281, {145, 173}
マラチオン ; 173, {125}

1-3-2) クロルピリホス個別試験法

- ・炎光光度検出器付きガスクロマトグラフ : GC-2010 (島津製作所製)

- ・カラム : DB-5, 0.53 mm φ × 10 m, 膜厚 1.5 μm (Agilent J&W 製)
- ・カラム温度 : 80°C (1分) -8°C/分-125°C (5分)
- ・注入口温度 : 230°C
- ・検出器温度 : 280°C
- ・キャリアーガス : ヘリウム

1-4) 試験法

1-4-1) GC/MS による農薬等の一斉試験法 (農産物) (厚生労働省通知法)

試料 20.0 g を量り採り、これにアセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル 20 mL 加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。得られた抽出液 20 mL を採り、塩化ナトリウム 10 g および 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) 20 mL を加え、振とうした。静置した後、分離した水層を捨てた。アセトニトリル層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物にアセトニトリルおよびトルエン (3:1) 混液 2 mL を加えて溶かした。

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg/500 mg) に、アセトニトリルおよびトルエン (3:1) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに上述操作で得られた溶液を注入した後、アセトニトリルおよびトルエン (3:1) 混液 20 mL を注入し、全溶出液を 40°C 以下で 1 mL 以下に濃縮した。これにアセトン 10 mL を加えて 40°C 以下で 1 mL 以下に濃縮

し、再度アセトン 5 mL を加えて濃縮し、溶媒を除去した。残留物をアセトンおよび n-ヘキサン (1:1) 混液に溶かして、正確に 1 mL としたものを試験溶液とした。

操作の概略をフローチャート 1 に示した。

1-4-2) クロロピリホス個別試験法 (EPN、アニコホス、イサゾホス、イプロベンホス、エチオン、エディフェンホス、エトプロホス、エトリムホス、カズサホス、キナルホス、クロロピリホス、クロロピリホスメチル、クロルフェンビンホス、シアノホス、ジスルホトン、ジメチルビンホス、ジメトエート、スルプロホス、ダイアジノン、チオメトン、テトラクロルビンホス、テルブホス、トリアゾホス、トリブホス、トルクロホスメチル、パラチオン、パラチオンメチル、ピペロホス、ピラクロホス、ピラゾホス、ピリダフェンチオン、ピリミホスメチル、フェナミホス、フェニトロチオン、フェンスルホチオン、フェンチオン、フェントエート、ブタミホス、プロチオホス、プロパホス、プロフェノホス、プロモホス、ベンスリド、ホキシム、ホサロン、ホスチアゼート、ホスファミドン、ホスメット、ホレート、マラチオン、メカルバム、メタクリホス、メチダチオンおよびメビンホス試験法 (農産物) (厚生労働省通知法)

試料 20.0 g を量り採り、これにアセトン 100 mL を加え、3 分間細砕した後、ケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、アセトン 50 mL を加え、3 分間細砕した後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮

器中に合わせ、40℃以下でアセトン除去した。

これをあらかじめ飽和塩化ナトリウム溶液 100 mL を入れた 300 mL の分液漏斗に移した。酢酸エチルおよび n-ヘキサン (1 : 4) 混液 100 mL を用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせた。振とう機を用いて 5 分間激しく振り混ぜた後、静置し、酢酸エチルおよび n-ヘキサンの層を 300 mL の三角フラスコに移した。水層に酢酸エチルおよび n-ヘキサン (1 : 4) 混液 50 mL を加え、上記と同様に操作して、酢酸エチルおよび n-ヘキサンの層を上記の三角フラスコに合わせた。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら 15 分間放置した後、すり合わせ減圧濃縮器中にろ過した。次いで n-ヘキサン 20 mL を用いて三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を 2 回繰り返した。両洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で酢酸エチルおよび n-ヘキサンを除去した。この残留物にアセトンおよび n-ヘキサン (1 : 1) 混液 5 mL を加えて溶かした。

内径 15 mm、長さ 300 mm のクロマトグラフ管にカラムクロマトグラフィー用シリカゲル (粒径 63~200 μm) 5 g をアセトンおよび n-ヘキサン (1 : 1) 混液に懸濁させたもの、次いでその上に無水硫酸ナトリウム約 5 g を入れ、カラムの上端に少量のアセトンおよび n-ヘキサン (1 : 1) 混液が残る程度までアセトンおよび n-ヘキサン (1 : 1) 混液を流出させた。このカラムに上述操作で得られた溶液を注入した後、アセトンおよび n-

ヘキサン (1 : 1) 混液 100 mL を注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40℃以下でアセトンおよび n-ヘキサンを除去した。この残留物にアセトンを加えて溶かし、正確に 5 mL として、これを試験溶液とした。

操作の概略をフローチャート 2 に示した。

2. LC/MS によるサイクラミン酸の定量

2-1) 試料

粉末食品 (サイクラミン酸が残留していないことを確認して用いた。)

2-2) 試薬

・サイクラミン酸 (98.0%以上、和光純薬製)

2-3) 装置および測定条件

2-3-1) LC/MS によるサイクラミン酸の定量 (第 2 版食品中の食品添加物分析法 2000 変法)

・液体クロマトグラフ質量分析計

液体クロマトグラフ : 1200 Infinity Series (Agilent 製)

質量分析計 : 6460 Triple Quad LC/MS (Agilent 製)

・カラム : L-column ODS, 2.1 mm φ × 25 cm, 粒径 5 μm (CERI 製)

・カラム温度 : 40℃

・移動相 : 0.1%ギ酸-メタノール (7:3), 0.2 mL/min

・イオン化モード : ESI (-)

・測定モード : MRM

・測定イオン (m/z) : 178.1 → 79.8

2-3-2) HPLC-UV によるサイクラミン酸の定量、第 2 版食品中の食品添加物分析法 2000

- ・液体クロマトグラフ：LC-20A Series
(島津製作所製)
- ・カラム：L-column ODS, 4.6 mm φ × 25 cm,
粒径 5 μm (CERI 製)
- ・カラム温度：40℃
- ・移動相：アセトニトリル-水 (7:3), 1.0
mL/min
- ・測定波長：314 nm

2-4) 試験法

2-4-1) LC/MS によるサイクラミン酸の定量 (第 2 版食品中の食品添加物分析法 2000 変法)

試料 10.0 g を量り採り、これに蒸留水 30~40 mL を加えて沸騰水浴上で 15 分間加熱した。冷却後、蒸留水を加えて正確に 100 mL とした。遠心分離 (3000rpm 5 分間) 後、上澄液を試験溶液とした。

操作の概略をフローチャート 3 に示した。

2-4-2) HPLC-UV によるサイクラミン酸の定量 (第 2 版食品中の食品添加物分析法 2000)

試料 10.0 g を量り採り、これに蒸留水 30~40 mL を加えて沸騰水浴上で 15 分間加熱した。冷却後、蒸留水を加えて正確に 100 mL とした。遠心分離 (3000rpm 5 分間) した。

あらかじめメタノール 10 mL および蒸留水 10 mL を通過させコンディショニングした Sep-Pack plus C18 Environment 900 mg カートリッジと Bond Elut Jr SAX 500 mg カートリッジの順番に接続したものに上述操作で得られた抽出液を負荷した。流下後、蒸留水 10 mL で洗浄した。Sep-Pack plus C18 Environment 900 mg カートリッジを取り外した後、Bond Elut

Jr SAX 500 mg カートリッジに塩酸 (1→100) 10 mL を負荷した。

上述操作で得られた溶出液に硫酸溶液 2 mL および正確に n-ヘキサン 5 mL を加えた後、次亜塩素酸ナトリウム試液 (有効塩素 2.5%以上) 1 mL を加えて 1 分間激しく振とうした。水層 (下層) を除去後、ヘキサン層 (上層) に 5%炭酸水素ナトリウム溶液 25 mL を加えて 1 分間振とうした。下層を除去した後上層を分取し試験溶液とした。

操作の概略をフローチャート 4 に示した。

3. マラカイトグリーン (MG) およびロイコマラカイトグリーン (LMG) への食品添加物の影響調査

3-1) 試薬

- ・マラカイトグリーンしゅう酸塩 (99%以上、林純薬工業製)
- ・ロイコマラカイトグリーン (99%以上、林純薬工業製)
- ・亜硫酸水素ナトリウム (特級、和光純薬製)
- ・過酸化水素水 (特級、和光純薬製)

3-2) 装置および測定条件

- ・液体クロマトグラフ質量分析計
液体クロマトグラフ：1200 Infinity Series (Agilent 製)
質量分析計：6460 Triple Quad LC/MS (Agilent 製)
- ・カラム：L-column ODS, 2.1 mm φ × 25 cm,
粒径 5 μm (CERI 製)
- ・カラム温度：40℃
- ・移動相：アセトニトリル-0.01mol/L ギ酸アンモニウムの混液 (1:9) から

(1:0)までの濃度勾配を20分間で行い、(1:0)で10分間保持する、0.2 mL/min

- ・イオン化モード：ESI (+)
- ・測定モード：TICおよびMRM
- ・MRMターゲットイオン (m/z)：

MG; 329→313

329→208

LMG; 331→316

331→239

3-3) 操作

MGおよびLMGの20 μg/mLアセトニトリル溶液をそれぞれ5 mLずつとり、0.2% SO₂水溶液をそれぞれに加えて混和後、LC/MSにより変化を調べた。

別に0.2% H₂O₂水溶液をそれぞれに加えて混和後、同様にして変化を調べた。

C. D. 研究結果・考察

1. GC/MSによるクロルピリホス、フルトラニル、マラチオンの定量

GC/MSによる定量の例としてGC/MSによる農薬等の一斉試験法(農産物)によるほうれんそう中のクロルピリホス、フルトラニル、マラチオンを絶対検量線法およびマトリックス検量線法により定量した際の結果を表1に示した。測定対象農薬を含まないことを確認したほうれんそうに対して、各農薬それぞれを0.02 ppm相当添加回収した結果である。マトリックス検量線法のマトリックス標準溶液は、試験溶液と同時に調整したマトリックス試験溶液と標準溶液を1:1で混合調整した。同じ検査員が異なる日時に実施した2回の試行結果を示した。

絶対検量線法による回収率は119~200%でありマトリックス効果によるレスポンス

の増強を受けている事が分かる。各農薬それぞれを0.02 ppm相当添加回収した試験溶液のクロマトグラム(図1)上では妨害ピークは認められないので、いわゆるマトリックス効果による影響であると考えられる。一方、マトリックス検量線法による回収率は78~106%であり、レスポンスの増強は相殺されているが、試行2において回収率がいずれも80%以下になっている。マトリックス検量線法は検量線作成用標準溶液と、試験溶液のマトリックスの種類、濃度を等しくする事により、マトリックス効果の度合いを等しくして、定量精度を高める方法であるが、試験法の頑健性の程度により、同一試料から同時並行で抽出精製してもマトリックスに差が出る可能性を示している。

別の検査員がにんじんで同じ試験を実施して、絶対検量線法、マトリックス検量線法、標準溶液添加法を比較した結果を表2に示した。絶対検量線法による結果は回収率164~201%であり、表1の結果と差はなかったが、マトリックス検量線法による結果は回収率123~138%であり、表1の結果よりプラス側にバイアスがかかっている。一方、標準溶液添加法による結果は回収率95~107%であり、最も100%に近い回収率が得られた。

さらに別の検査員が添加量を10倍の0.2 ppmとしてにんじんで同じ試験を実施した結果を表3に示した。当該試験においても、標準溶液添加法による補正結果は良好であった。

また、質量分析計以外の検出器を用いた例として炎光光度検出器付きガスクロマトグラフィー(GC-FPD)によるクロルピリホスの添加回収試験の結果を表4に示した。

GC/MS と同様に 0.02 ppm 相当添加回収した結果で、異なる検査員が異なる日時に実施した結果をまとめたものである。回収率は 94~105%の範囲内、RSD は 3.28%であり、回収率、再現性ともに良好な結果であった。クロルピリホスを 0.02 ppm 相当添加回収した試験溶液のクロマトグラム（図 2）は GC/MS と比較して、夾雑ピークおよびベースラインの変動が目立つが、いずれもクロルピリホスの定量を妨害しない。

2. LC/MS によるサイクラミン酸の定量

サイクラミン酸は塩素処理誘導体化して HPLC-UV にて定量する方法が第 2 版食品中の食品添加物分析法 2000 に記載されているが、乾燥粉末食品等の一部では添加回収率が 0~30%程度に低下する場合がある。このような場合には HPLC-UV に代わり LC/MS により定量することがあるが、マトリックス効果が現れやすい。

今回検討した結果は表 5 に示したとおり、絶対検量線法によって 82~124%の回収率が得られたが、標準溶液添加法により回収率、再現性ともに向上した。図 3 は、試料 No. 3 の 20 ppm 標準添加試験溶液に 20 ppm 相当の標準溶液を 1:1 で混合した溶液のクロマトグラムで、妨害ピークは認められない。

今回実施した標準溶液添加法の概念を図 4 に示した。サイクラミン酸を 20 ppm 相当含む試験溶液に対して、0、20、40 ppm 相当の標準溶液を 1:1 で混合した時、それぞれのレスポンスは $(20+0) / 2=10$ 、 $(20+20) / 2=20$ 、 $(20+40) / 2=30$ ppm 相当であることが期待されるので、回帰分析結果から $y=0$ に外挿することにより試験

溶液中の濃度を求められる。

マトリックス検量線法では先に述べたとおり、試験溶液と検量線作成用標準溶液のマトリックスはそれぞれ別に作成するため、試験法の頑健性の程度により、同一試料から同時並行で抽出精製してもマトリックスに差が出る可能性があるが、標準溶液添加法では試験溶液が均一である限りマトリックスに差が出る事はない。また、マトリックス検量線用のマトリックスを別途調製する必要がない。標準溶液添加法では、試料数の増加に伴いクロマトグラフィーの測定回数が増加するが、人手を省ける上に、より正確な結果が得られる点で、標準溶液添加法はマトリックス検量線法より優れている。

3. MG および LMG への食品添加物の影響調査

MG 標準品 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) のトータルイオンクロマトグラムを図 5 に、質量スペクトルを図 6 に示した。MG の保持時間は 15.6 分、質量スペクトルでは擬分子イオン $[\text{M}-\text{H}^+]=329+$ の他に水付加体イオン $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}^+]=347+$ が確認された。

MG の 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アセトニトリル溶液は濃い青緑色であるが、0.2% SO_2 水溶液を加えると直ちに退色し、6 時間後には図 7 に示した通り、MG は初期の 30%にまで減少し、保持時間 11.8 分に大きなピークが生じた。このピークの質量スペクトルには図 8 に示した通り $[\text{M}-\text{H}_2\text{SO}_3-\text{H}^+]=411+$ が認められることから、MG- SO_2 付加体の生成が考えられた。

MG に 0.2% H_2O_2 水溶液を加えた系においては 6 時間後もピーク強度、質量スペクトルに変化は認められなかった。

LMG 標準品 (10 $\mu\text{g/mL}$) のトータルイオンクロマトグラムを図 9 に、質量スペクトルを図 10 に示した。LMG の保持時間は 18.4 分、質量スペクトルでは擬分子イオン $[\text{M-H}^+]=331+$ が確認された。

LMG に 0.2% SO_2 水溶液を加え、6 時間後には図 11 に示した通り、LMG は初期より 5% 程度減少し、保持時間 11.8 分にピークが生じた。このピークの質量スペクトルには図 12 に示した通り MG の擬分子イオン $[\text{M-H}^+]=329+$ の他に $[\text{M-SO}_3\text{-H}^+]=409+$ が認められた。

LMG に 0.2% H_2O_2 水溶液を加えた場合、6 時間後には図 13 に示した通り、LMG は初期より 3% 程度減少し、保持時間 10.2 分にピークが生じた。このピークの質量スペクトルには図 14 に示した通り MG の擬分子イオン $[\text{M-H}^+]=329+$ の他に水付加体イオンであると考えられる $[\text{M-H}_2\text{O-H}^+]=347+$ が確認された。

E. 結論

1. GC/MS によるクロルピリホス等の定量においては、GC-FPD によるクロルピリホス個別試験法と比べて定量精度、再現性ともに劣っていた。GC/MS においては、絶対検量線法による回収率が 115~201% であったが、マトリックス検量線法による回収率は 78~148% であり、厚生労働省が示している精度管理ガイドライン(平成 9 年 4 月 1 日)、試験法妥当性評価ガイドライン(平成 22 年 12 月 24 日)に規定されている真度 70~120% の範囲から一部はずれていた。一方、試験溶液への標準溶液添加法による回収率は 91~107% であり、より簡便、高精度なマトリックス効果補正方法であることを実

証した。

2. LC/MS によるサイクラミン酸の定量においては、標準溶液添加法により簡便かつ高精度に定量を行う事ができた。標準溶液添加法は人手を省ける上に、より正確な結果が得られる点で、マトリックス検量線法より優れていた。

3. MG および LMG への食品添加物の影響調査の結果、MG は二酸化硫黄と反応性が高く付加体を生成している可能性が高いことが分かった。また、MG は過酸化水素との反応性は低いことが分かった。一方、LMG は二酸化硫黄、過酸化水素ともに若干反応するが、6 時間室内放置後の減衰はともに 5% 以内であった。以上の結果から、検体中に含まれる二酸化硫黄を過酸化水素により酸化処理することにより、MG および LMG の添加回収試験を阻害する可能性がある二酸化硫黄の影響を除去できる可能性が示された。

F. 健康危機情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表等 なし

2. 学会発表等

1) 村山三徳：日本の動物用医薬品の法制度と求められる安全対策，青島誠誉食品検測有限公司・食品安全セミナー(2013.6.6)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

試料：野菜類 20.0 g

↓ ホモジナイズ：アセトニトリル 50 mL, 吸引ろ過
ろ紙上残留物

↓ ホモジナイズ：アセトニトリル 20 mL, 吸引ろ過
ろ液を合わせアセトニトリルを加えて 100 mL

↓
抽出液 20 mL

↓ 塩析：塩化ナトリウム 10 g, 0.5 M リン酸緩衝液 (pH7.0) 20 mL
アセトニトリル層

↓ 脱水：無水硫酸ナトリウム, 溶媒留去
アセトニトリル-トルエン (3:1) 2 mL

↓
グラファイトカーボン/アミノプロピルシリカ積層ミニカラム

↓ アセトニトリル-トルエン (3:1) 20 mL 溶出, 溶媒留去
試験溶液：アセトン-ヘキサン (1:1) 1 mL

↓
GC/MS

フローチャート 1 GC/MS による農薬等の一斉試験法 (農産物)