

国立医薬品食品衛生研究所における人体(血液・尿等)試料中の 毒物の検査手法の開発と標準化

研究分担者 穂山 浩(国立医薬品食品衛生研究所)
研究協力者 田口貴章(国立医薬品食品衛生研究所)
研究協力者 岡部信彦(川崎市健康安全研究所)
研究協力者 赤星千絵(川崎市健康安全研究所)
研究協力者 岸 美紀(川崎市健康安全研究所)

研究要旨

食品テロ等、意図的毒物混入事件時に健康被害が発生した場合、原因物質究明のため、食品のみならず曝露された人に対する検査も迅速に行うことが必要である。これには保健所や行政機関での対応が不可欠であるが、人体(血液・尿等)試料中の毒物の検査方法は十分には開発されておらず、また標準化もされていなかった。そこで、本分担研究において、人体試料中の有機リン系農薬、カルバメート系農薬、ヒ素、重金属、及びシアン化合物等天然有害物を対象として検査手法の開発と標準化に取り組んだ。人体試料中の有機リン系農薬 46 種、カーバメート系農薬 16 種、及びシアン化合物等天然有害物としてシアン配糖体 2 種を検出できる LC-MS/MS 分析法を確立した。これらの LC-MS/MS 条件は化合物群ごとに異なるが、抽出法は統一して簡便化を図った。重金属は、ヒ素、鉛、6 価クロムを検出できる ICP-MS 分析法を確立した。

A. 研究目的

食品テロ等の毒物等混入事件が発生した場合、地方衛生研究所(地衛研)は保健所等の関係部局との緊密な連携の下、原因解明のため食品のみならず被害者の人体(血液・尿等)試料の検査も迅速に行うことが必要である。しかし、人体試料中の毒物の検査方法は十分には開発されておらず、また標準化もされていなかった。

毒物等混入事件発生の際には、より迅速かつ簡便な試料調製が重要である。また、人体試料中の毒物等、特に農薬等を高感度に分析するには LC-

MS/MS や GC-MS/MS が最適だと思われるが、分析機関の通常業務で当該機器を別目的で使用している状態から緊急の分析へ分析法を変更するには時間がかかり、迅速な分析が困難となる可能性が高い。よって、比色法等による一次スクリーニングで毒物の種類を大別した後 GC-MS、LC-MS/MS 等による原因物質特定のための分析法を組み合わせ、図 1 に示すような体系的な毒物検査手法を開発し標準化することが必要と考えた。

食品テロ等、意図的な毒物混入事件において使用される毒物として、過去の事例から推察し、農

薬、重金属、シアン化合物等天然有害物を想定した。これらはそれぞれ適切な分析法が異なることから、類似の化合物ごとに分析法を検討し、後に統合する方針として、各種毒物の検出方法の検討を進めることとした。

B. 研究方法

(1) 人体試料

血液はコスモ・バイオ株式会社が販売するヒト全血 A 型（個体別、品番 12081445、450 mL [1 バッグ]）を、国立医薬品食品衛生研究所の研究倫理審査を受け、条件付き承認を得た後で購入した。購入後、未開封のバッグを 4°C で約 1 か月保管した後、約 50 mL ずつ 10 本のバイアルに分注し、5 本を 4°C で、残り 5 本を -20°C で保管した。使用直前に、冷蔵保管のものから必要量を取り、40°C の水浴で加温してから実験に用いた。

尿は、「JIS T 3214:2011 ぼうこう留置用カテーテル」に記載の組成（表 1）の人工尿を調製し使用した。

(2) 分析対象化合物

有機リン系農薬：ジメトエート (Dmet)、ジクロルボス (DDVP)、マラチオン (MLT)、フェニトロチオン (MEP)、エディフェンホス (EDDP)、プロチオホス (PTF)、アセフェート (AP)、メタミドホス (MMP) の 8 種及び代謝物としてマラオキシソン (MLX)、並びに「有機リン系農薬混合標準液」FA-1、FA-2、FA-3（いずれも FUJIFILM Wako 製）に含まれる計 56 種（表 2～6）。

カーバメート系農薬：オキサミル等 17 種（表 7～11）。

重金属：ヒ素 (As、三酸化二ヒ素として)、鉛 (Pb、塩化鉛として)、亜鉛 (Zn、塩化亜鉛とし

て)、6 価クロム (Cr⁶⁺、クロム酸カリウムとして) の 4 種。

シアン配糖体：リナマリン（キャッサバ等）及びアミグダリン（びわ、アーモンド等）の 2 種。

(3) 有機リン系農薬 6 種の HPLC 分析法の検討

Dmet、DDVP、MLT、MEP、EDDP、PTF の 6 種農薬について、混合標準溶液（共にメタノール溶液）を調製し、HPLC 分析条件を種々検討した。

人体試料は人工尿のみ用いて前処理法を検討した後、6 種農薬混合標準液を加え定量限界について検討した。

(4) 有機リン系農薬 8 種及び代謝物の LC-MS/MS 分析法の検討

有機リン系農薬 8 種 (MMP・AP・Dmet・DDVP・MLT・MEP・EDDP・PTF) 及び代謝物 MLX について、混合標準溶液を調製し、LC-MS/MS 分析条件を種々検討した。

人体試料はヒト全血又は人工尿を用いて前処理法を検討した後、9 種農薬等混合標準液を加え回収率及び定量限界について検討した。

(5) 有機リン系農薬 56 種の LC-MS/MS 分析法の検討

市販の有機リン系農薬の混合標準溶液を利用し、54 項目 56 成分について添加回収試験を行い、回収率を網羅的に検討・評価した。

(6) 有機リン系農薬の簡易検出キットによる分析

比色法による一次スクリーニングとして、市販の簡易検出キット「有機リン系農薬検出キット」（関東化学）が適用できるか否か、検討した。尚、

本品は尿または吐瀉物を対象とした製品で、20種の有機リン系農薬の検出感度が明記されている。

(7)カーバメート系農薬 17種の LC-MS/MS 分析法の予備検討

上(4)の有機リン系農薬の抽出法及び LC-MS/MS 分析条件で、カーバメート系農薬 17種についてマトリックス効果を検証した後、添加回収試験を行いマトリックス標準溶液に対する回収率を評価した(表5)。

(8)カーバメート系農薬 17成分の LC-MS/MS 分析法の検討

カーバメート系農薬をより高感度で検出できるように、上(7)の LC-MS/MS 分析条件の改良を検討した。併せて、抽出溶媒としてアセトンの適用可否についても検討した。

(9)シアン配糖体の LC-MS/MS 分析法の検討

比色法を利用したシアン配糖体の検出キットがないため、LC-MS/MS での分析法を検討した。検討にあたっては、上(6)~(8)の人体試料中の農薬分析における LC-MS/MS を基に条件検討を行ったうえで、添加回収試験を実施した。

(10)ヒ素、鉛、亜鉛、6価クロムの水質検査用簡易キットによる分析法の検討

環境水中の各種重金属を分析するため、水質検査用簡易キットとして「パックテスト(共立理化学研究所)」が市販されている。パックテストは比色法により対象金属を検出、定量するものであり、金属ごとに最適な試薬と操作方法が異なる。

10-1. 人体試料への適用可否の検討

環境水と人体試料では、夾雑成分の種類・量が

全く異なるため、前処理をしない人体試料にパックテストが適用可能か否か、検討した。

10-2. 固相抽出との組合せによる分析法の検討

上10-1の検討において、血液試料は全て適用不可、尿試料は6価クロムのみ不可と判断した。人体試料を精製することでパックテストが使用可能となる可能性を考慮し、無機元素分析用キレート樹脂を用いた固相抽出とパックテストを組み合わせた分析法を検討した。

10-3. 有機溶媒での抽出法との組合せによる分析法の検討

上10-2の検討において、固相抽出による血液試料の精製は困難であり、また、亜鉛と鉛は溶出液が呈色原理を阻害するため、使用できなかった。尿試料中のヒ素及び6価クロムは、回収率が低かった。そこで、血液試料中のヒ素のみを対象として、農薬やシアン配糖体の分析を応用した有機溶媒抽出とパックテストの組合せによる分析法を検討した。

(11)ヒ素、鉛、6価クロムの ICP-MS 分析法の検討

誘導結合プラズマ質量分析法(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry、ICP-MS)は、アルゴンガスに高周波電力を印可して生成した誘導結合プラズマ(Inductively Coupled Plasma)をイオン源に用い、プラズマによってイオン化された試料中の元素を質量分析計(MS)によって分離、検出する元素分析のための手法である。装置は高額であるが、様々な分野で汎用されている金属元素分析法であり、微量分析も可能であることから、人体試料中ヒ素、鉛、6価クロムの分析を検討した。

C. 研究成果

(1) 有機リン系農薬 6 種の HPLC 分析法の検討

①前処理法

尿試料は、使用直前に 40 °C の水浴で 10 分間加温してから用いた。シリンジフィルター又は前処理用限外濾過ユニット（コスモスピンフィルター H、Nacalai tesque 製）の利用を検討したが、低～中極性の化合物がろ過膜に吸着した。少なくとも目視において尿試料は清澄だったため、前処理せずに HPLC 分析に供した。

②分析試料

Dmet・DDVP・MLT・MEP・EDDP・PTF の 6 種をメタノールに溶解し 1 mg/mL の標準原液を調製した後、各 100 µg/mL となる混合標準溶液を調製した。これを水、人工尿、メタノールに必要量添加し、それぞれの溶液について 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 ng/µL の 6 点の検量線用標準溶液を調製した。

③HPLC 条件

装置：Acquity UPLC H-Class (Waters)

カラム：Acquity UPLC BEH C18 (1.7 µm),

2.1 x 100 mm (Waters)

温度：40 °C

移動相：A)水、B)アセトニトリル

グラジエント条件：0 min: 5%B, 1 min: 5%B,

3 min: 45%B, 8 min: 45%B,

10 min: 95%B, 11 min: 95%B,

12 min: 5%B, 17 min: 5%B

流速：0.3 mL/min

検出器：多波長検出器

測定波長：210 nm (Dmet, DDVP, MLT, PTF),

260 nm (MEP, EDDP)

注入量：1.5 µL

④検量線の評価

得られた検量線を図 2 に示した。メタノールでは全ての農薬で $r^2=0.99$ 以上の良好な直線性が確認されたが、水では PTF、人工尿では DDVP, MLT, MEP, EDDP, PTF で $r^2=0.99$ を下回る結果となった。特に PTF は、水、人工尿で希釈した同じサンプルを連続で注入してもばらつきが大きく定量は困難であると判断した。DDVP は、人工尿のみ面積値が低く検出された。MLT, MEP, EDDP はメタノール溶液に比べ水、人工尿中ともに、同程度の面積値低下が観察された。

得られた結果から、PTF 以外は、尿中濃度 0.25 µg/mL (≒ 250 ppb) まで検出可能と考えられた。

(2) 有機リン系農薬 8 種及び代謝物の LC-MS/MS 分析法の検討

①前処理法

血液試料又は人工尿試料は、使用直前に 40 °C の水浴で 10 分間加温してから用いた。血液又は人工尿 250 µL をマイクロチューブにとり、2 倍量 (500 µL) のメタノールを加えヴォルテックスミキサーで 20 秒間攪拌した後、冷蔵庫 (4 °C) で 10 分間静置した。12,000 ×g, 4 °C で 10 分間遠心分離し、上清の一部をコスモスピンフィルター H にて限外ろ過して得られたろ液を試料溶液として LC-MS/MS 分析に供した。

②分析試料

対象化合物無添加の血液試料、又は尿試料を前処理して得た試料溶液をブランク試料とし、ブランク試料に農薬等を 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15, 20 ng/mL の各濃度となるよう添加したものを検量線作成用マトリックス標準溶液とした。

血液試料、又は尿試料に対象農薬等を各 10 ng/mL 又は 50 ng/mL となるよう添加したものを前処理し、得た溶液を添加回収試験試料とした。

各試料中の農薬等の濃度は、絶対検量線法により求めた。

③LC-MS/MS 条件

LC 条件

装置：Acquity UPLC H-Class (Waters)

カラム：Acquity UPLC BEH C18 (1.7 μ m),
2.1 x 100 mm (Waters)

温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：A) 0.1% ギ酸水溶液、

B)0.1% ギ酸含有アセトニトリル溶液
グラジエント条件：0 min: 5%B, 1 min: 5%B,
3 min: 45%B, 8 min: 45%B,
10 min: 95%B, 11 min: 95%B,
12 min: 5%B, 17 min: 5%B

流速：0.3 mL/min

検出器：多波長検出器

測定波長：210 nm (Dmet, DDVP, MLT, PTF)、
260 nm (MEP, EDDP)

注入量：1.5 μ L

MS 条件

装置：Xevo TQ-S micro

イオン化：ESI(+)

Acquisition: MRM

Capillary voltage: 0.75 kV

Cone voltage: 50 V

Desolvation temp.: 600 $^{\circ}$ C

Desolvation gas flow: 1000 L/Hr

Cone gas flow: 50 L/Hr

定量用 m/z :

MMP: 142.0 \rightarrow 93.9

AP: 183.9 \rightarrow 143.0

Dmet: 230.1 \rightarrow 125.0

DDVP: 221.0 \rightarrow 109.0

MLX: 315.0 \rightarrow 98.9

MLT: 331.0 \rightarrow 127.0

MEP: 278.0 \rightarrow 109.1

EDDP: 311.0 \rightarrow 109.0

PTF: 345.1 \rightarrow 240.9

④検量線の評価

血液試料の検量線の r^2 は MEP, PTF 以外で 0.99 以上、MEP も 0.983 と良好なものが得られた (表 2)。AP 以外は常に妨害ピークが検出された。妨害ピークの面積値を下回るピークはどの農薬のどの濃度でもなかったが、「妨害ピーク的面積値の 10 倍以上を与える実測濃度を定量限界」とし、Dmet, MEP の定量限界は 20 ng/mL 以上と判断した。また、PTF においては、同じ試料を 2 回分析して得られた面積値のばらつきが大きく良好な直線性を得られず、定量評価は不能であった。よって、本報告における濃度域 (2.5 ~ 20.0 ng/mL) において、Dmet, MEP, PTF は定性分析のみ可能であり、他の農薬等 6 種は定量限界 2.5 ng/mL と判断した。

尿試料の検量線は PTF と MEP の r^2 が 0.99 未満だった以外、良好な直線性を得られた (表 3)。Dmet, MLX, MLT, MEP, EDDP には常に妨害ピークが検出された。妨害ピーク的面積値を下回るピークはどの農薬のどの濃度でもなかったが、「妨害ピーク的面積値の 10 倍以上を与える実測濃度を定量限界とする」ことから、Dmet の定量限界は 10 ng/mL、MEP の定量限界は 15 ng/mL と判断した。また、PTF においては、血液試料と同じく面積値のばらつきが大きく良好な直線性を得られず、定量評価は不能であった。よって、本報告における濃度域 (2.5 ~ 20.0 ng/mL) において、PTF は定性分析のみ可能であり、Dmet, MEP の定量限界は上記の通り、他の農薬等 6 種は定量限界 2.5 ng/mL と判断した。

⑤添加回収試験

添加回収試験は一度に5試行を行い、5回の平均濃度 (conc., ng/mL) と並行精度 (RSD, %) を求めた。血液の2倍量のメタノールを加えるため、100%回収されるとすると試料溶液中の農薬濃度は3.3 ng/mLとなる。この濃度に対する試料溶液中の濃度の割合 (%) を回収率とした。

血中濃度10 ng/mLでは、回収率が0~58%程度とかなり低かった(表2)。特に、DDVP, PTFは算出された濃度が0 ng/mLを下回ってしまったため、試料中濃度平均を0 ng/mLとした。MEPは、分析5回中2回が0 ng/mLとなり並行精度の値が著しく高く算出された。農薬全種類において試料中濃度が検量線の最低濃度(2.5 ng/mL)を下回ったうえ並行精度も良好でなかった。一方、血中濃度50 ng/mLでは、PTF以外、回収率、並行精度ともに十分な数値を得られた(表2)。DDVPは回収率が低い傾向が認められるが、MMP, AP, MLX, MLT, EDDPについては、本法で得られた試料溶液中に16.7 ng/mL前後、あるいはそれ以上の濃度として検出されたならば、その3倍の濃度(50 ng/mL以上)で血中に存在していると想定でき、濃度推定可能と考えられる。

尿試料からの回収率は、尿試料中濃度が50 ng/mLであればPTF以外100%前後となったが、10 ng/mLでは61~88%であり、血液試料同様、添加濃度に依存する可能性が示唆された(表3)。並行精度は、PTFが両濃度で値が大きいが、前述の通り定量性の保証されない濃度域である。MEPで3.5%程度と若干大きな値であったが、定量限界15 ng/mL付近だからだと考えられる。DDVP, 10 ng/mLの並行精度が2回目のみ大きな値を示したが、この理由については今後検証が必要である。これら以外の農薬の並行精度は良好であった。

(3) 有機リン系農薬56種のLC-MS/MS分析法の検討

①前処理法

上(2)①の記載内容と同じ。

②分析試料

上(2)②の記載内容と同じ。

③LC-MS/MS条件

LC条件

装置: Acquity UPLC H-Class (Waters)

カラム: Acquity UPLC BEH C18 (1.7 μm),
2.1 x 100 mm (Waters)

温度: 40 °C

移動相: A) 0.1% ギ酸水溶液、

B) 0.1% ギ酸含有アセトニトリル溶液

グラジエント条件: 0 min: 5%B, 9 min: 95%B,

12 min: 95%B, 13 min: 5%B, 15 min: 5%B

流速: 0.3 mL/min

注入量: 1.5 μL

MS条件

装置: Xevo TQ-S micro (Waters)

イオン化: ESI(+)

Acquisition: MRMモード

Capillary voltage: 0.75 kV

Source temperature: 150 °C

Desolvation temperature: 600 °C

Cone gas flow: 50 L/hr

Desolvation gas flow: 1,000 L/hr

Cone voltage (CV) and Collision energy (CE):

Quanpedia (Waters)に登録の条件、又は IntelliStart (Waters)で最適化した条件を使用。プリカーサーイオン及び定量イオンの m/z は表5に示した。

④添加回収試験

血液・尿等人体試料中の有機リン系農薬を迅速に検出するための抽出法は上(2)で確立したものをを用いた。LC-MS/MS分析法はLC条件を一部変更した。本法における前処理は約25分、LC-MS/MS分析時間は注入1回あたり15分であった。

溶媒標準溶液の分析において、56成分中47成分が検出可能であった(表5)。マトリックス効果を検証した後、添加回収試験を行いマトリックス標準溶液に対する回収率を算出した(表6)。

血液試料は、農薬各50 ng/mL添加した試料から47成分検出、回収率は44.2-163.0%であり、農薬各10 ng/mL添加した試料からは44成分検出、回収率は45.6-155.7%であった。

人工尿試料は、農薬各50 ng/mL添加した試料から46成分検出、回収率は55.6-110.4%であり、農薬各10 ng/mL添加した試料からは43成分検出、回収率は32.2-113.4%であった。

マトリックス効果の日間変動が大きい農薬があり、また、保持時間の遅い農薬の回収率が低下する傾向が認められた。

(4) 有機リン系農薬の簡易検出キットによる分析

人工尿に、検出感度1 ppmとされているジメトエート(Dmet)、又はジクロロボス(DDVP)を添加し添付のマニュアル通り操作したところ、試験管中で二層分離した液体の上層がはっきりと紫色を呈した(図3_A & B)。同様に、検出感度10 ppmのアセフェート(AP)と100 ppmのメタミドホス(MMP)について確認したところ、APは色が薄いながらも呈色したことを確認できた(図3_C)、MMPは色調変化を確認できなかった(図3_D)。

続いて血液試料にDDVPを10 µg/mLとなるよ

う添加したものを対象とした操作について検証した(図4)。前処理なしの血液試料、及び遠心分離後の上澄みを試料とした場合は、操作途中に凝固したため検出不可であった。血液試料に2倍量の水を加えて希釈したものは、操作途中に凝固はしなかったものの最後に液相分離しなかったため検出不可であった(図4_A~C)。LC-MS/MS用試料、即ち2倍量のメタノールを添加して攪拌し、4°Cで10分静置後、遠心分離し(12,000×g, 4°C, 10分)、上清をフィルターろ過(0.45 µm)したものの試料としたところ、下層の液量が減少したものの、上層は清澄で薄紫色を呈することを確認できた(図4_D)。検出感度がDDVPと同じ1 ppmのDmet、及び10 ppmのAPについても、LC-MS/MS用試料であれば2層分離した上層が薄紫色を呈し、本簡易キットが適用可能であることを確認した(図4_E~F)。

(5) カーバメート系農薬17種のLC-MS/MS分析法の予備検討

①前処理法

上(2)①の記載内容と同じ。

②分析試料

上(2)②の記載内容と同じ。

③LC-MS/MS

上(3)③の記載内容と同じ。プリカーサーイオン及び定量イオンのm/zは表7に示した。

④添加回収試験

添加回収試験の結果を表8に示した。血液試料は、農薬各50 ng/mL添加した試料から16成分検出、回収率は37.9-150.5%であり、農薬各10 ng/mL添加した試料からは16成分検出、回収率は37.7-185.8%であった。尿試料は、農薬各50 ng/mL添加した試料から17成分検出、回収率は11.8-

118.0%であり、農薬各 10 ng/mL 添加した試料からは 17 成分検出、回収率は 0.6 – 119.1%であった。マトリックス効果の日間変動が大きい農薬があり、また、保持時間の遅い農薬の回収率が低下する傾向が認められた。

(6) カーバメート系農薬 17 成分の LC-MS/MS 分析法の検討

①前処理法

血液試料又は人工尿試料は、使用直前に 40 °C の水浴で 10 分間加温してから用いた。血液又は人工尿 250 µL をマイクロチューブにとり、2 倍量 (500 µL) のメタノール又はアセトンを加えヴォルテックスミキサーで 20 秒間攪拌した後、冷蔵庫 (4 °C) で 10 分間静置した。12,000 ×g, 4 °C で 10 分間遠心分離し、上清の一部をコスモスピンフィルターH (ナカライテスク社製) にて限外ろ過して得られたろ液を試料溶液として LC-MS/MS 分析に供した。

②分析試料

対象化合物無添加の水、血液、又は人工尿を前処理して得た試料溶液をブランク試料とし、ブランク試料にカーバメート系農薬各 16.7 ng/mL となるよう添加したものをマトリックス標準溶液とした。

水、血液、又は人工尿にカーバメート系農薬各 50 ng/mL となるよう添加したものを前処理し、得た溶液を添加回収試験試料とした (水は空試験)。各試料中の農薬濃度は、絶対検量線法により求めた。

③LC-MS/MS 条件

LC 条件

装置: Acquity UPLC H-Class (Waters)

カラム: Acquity UPLC BEH C18 (1.7 µm),

2.1 x 100 mm (Waters)

温度: 40 °C

移動相: A) 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液、

B) 5 mM 酢酸アンモニウム含有メタノール溶液

グラジエント : 0 min: 15%B, 1 min: 40%B,

9 min: 95%B, 14 min: 95%B,

15 min: 15%B, 20 min: 5%B

流速: 0.2 mL/min、

注入量: 1.5 µL

MS/MS 条件

装置: Xevo TQ-S micro (Waters)

イオン化: ESI (+)

Acquisition: MRM モード

Capillary voltage: 0.75 kV

Source temperature: 150 °C

Desolvation temperature: 600 °C

Cone gas flow: 50 L/hr

Desolvation gas flow: 1,000 L/hr

Cone voltage (CV) and Collision energy (CE):

Quanpedia (Waters) に登録の条件、又は IntelliStart (Waters) で最適化した条件を使用。プリカーサーイオン及び定量イオンの m/z は表 9 に示した。

④添加回収試験

水試料 (空試験)、血液試料、尿試料から、メタノールを用いた添加回収試験の結果を表 10 に、アセトンを用いての結果を表 11 に示した。また、試料マトリックスの測定への影響について検討するため、添加回収試験における回収率 100% 相当濃度 (16.7 ng/mL) に調製したマトリックス添加標準溶液を測定し、その実測値の回収率 100% 相当濃度に対する比をマトリックス効果として評価した (表 10, 11)。

水試料からの回収試験 (空試験) は、保持時間

が 10 分以降の 4 種の回収率が 70%未満となったが、その他 13 種の回収率は 97.8 から 104.1%であった (表 10)。水からメタノールで前処理して得た空試験試料のマトリックス効果は 17 種すべて 0.91 から 1.05 の範囲であり、溶媒混合標準溶液中の強度と同程度であった。

血液試料の添加回収試験での回収率は、メソミルが 164.1%でチオジカルブは 0%であった。空試験で回収率の低かった 4 種、アラニカルブ、ベンフラカルブ、フラチオカルブ、カルボスルファンはそれぞれ 96.9%、95.7%、13.4%、66.8%であり、その他は 94.7%から 103.7%の範囲の値であった。アラニカルブ、ベンフラカルブはと良好な回収率であり、カルボスルファンも 70%未満であったものの、空試験の回収率よりは高かったが、フラチオカルブのみ、空試験よりさらに低い回収率となった (表 10)。血液試料のマトリックス効果は、メソミルが 1.66 と高かった一方、チオジカルブが 0.04 と極めて低い値で、フラチオカルブも 0.78 と低かった。他は 0.92 から 1.07 の範囲に収まった。

尿試料からの回収率は、チオジカルブ、ベンフラカルブ、フラチオカルブ、カルボスルファンがそれぞれ 53.2%、60.5%、52.1%、39.0%であったが、他は 82.2%から 119.5%の範囲であった。アラニカルブを含む、空試験で回収率の低かった 4 種すべて、空試験より高い回収率であった (表 4)。尿試料のマトリックス効果は、チオジカルブが 0.73 と少し低かったが、他は 0.92 から 1.11 の範囲に収まった。

カルバメート系農薬には、メタノールよりアセトンに易溶なものがあること、並びに、生化学研究での酵素精製においてアセトン沈殿による濃縮操作を行うことがあることから、抽出溶媒としてアセトンについても検討した。

水試料からの回収試験 (空試験) では、メタノール抽出と同様、保持時間が 10 分以降のアラニカルブ、ベンフラカルブ、フラチオカルブ、カルボスルファンはそれぞれ 70.2%、38.3%、44.3%、22.5%であり、98.7%から 113.7%の範囲の値となった他の化合物に比べると低い回収率であったが、メタノール抽出より高い値となった (表 11)。水からアセトンで前処理して得た試料のマトリックス効果は 1.16 から 1.26 であり、17 種全てのカーバメート系農薬の強度が、溶媒混合標準溶液中の強度の 1.2 倍程度に増強され、回収率の高さと相関が認められた。

血液試料からの回収率は、0%であったチオジカルブを除くと 921%から 200.0%の範囲となり、13 種化合物が 120%を超える結果となった。特にメソミルは 200%と極めて高い回収率が示された (表 11)。血液試料をアセトンで前処理したもののマトリックス効果は、メソミルが 1.29 と高く、チオジカルブは 0.99、カルボスルファンが 0.96 と低かったが、他は 1.13 から 1.25 の範囲の値であり、メタノール抽出ほど大きな差異ではなかった。

尿試料からの回収率は空試験の回収率と類似の傾向があり、ベンフラカルブ、フラチオカルブ、カルボスルファンがそれぞれ 64.1%、62.6%、36.4%と低値であったが、アラニカルブを含む他の 14 種は 88.2%から 112.1%の範囲であった (表 11)。尿試料のマトリックス効果はオキシミルが 1.05 と低く、カルボスルファンが 1.35 と高かった。他は 1.11 から 1.26 の範囲に収まった。

(7) シアン配糖体の LC-MS/MS 分析法の検討

①前処理法

上(6)①の記載内容と同じ。

②分析試料

対象化合物無添加の水、血液、又は人工尿を前処理して得た試料溶液をブランク試料とし、ブランク試料にシアン配糖体各 167 ng/mL となるよう添加したものをマトリックス標準溶液とした。

水、血液、又は人工尿にシアン配糖体各 500 ng/mL となるよう添加したものを前処理し、得た溶液を添加回収試験試料とした（水は空試験）。各試料中のリナマリン、アミグダリン濃度は、絶対検量線法により求めた。

③LC-MS/MS 条件

LC 条件

装置: Acquity UPLC H-Class (Waters 社)

カラム: Acquity UPLC BEH C18 (1.7 μ m),
2.1 x 100 mm (Waters)

温度: 40 °C

移動相: A) 0.1% 酢酸水溶液、B) アセトニトリル
グラジエント : 0 min: 10%B, 5 min: 45%B,
6 min: 95%B, 10 min: 95%B,
11 min: 10%B, 15 min: 10%B

流速: 0.2 mL/min、

注入量: 1.0 μ L

MS/MS 条件

装置: Xevo TQ-S micro (Waters)

イオン化: ESI

Acquisition: MRM モード

Capillary voltage: 0.4 kV

Source temperature: 150 °C

Desolvation temperature: 600 °C

Cone gas flow: 50 L/hr

Desolvation gas flow: 1,200 L/hr

Cone voltage (CV) and Collision energy (CE): マニュアル操作で最適化した。プリカーサーイオン及び定量イオンの m/z は表 3 に示した。

④添加回収試験

水試料（空試験）、血液試料、尿試料から、メタノール又はアセトンを用いた添加回収試験の結果を表 12 に示した。また、試料マトリックスの測定への影響について検討するため、添加回収試験における回収率 100%相当濃度（167 ng/mL）に調製したマトリックス添加標準溶液を測定し、その実測値の回収率 100%相当濃度に対する比をマトリックス効果として評価した（表 12）。

リナマリンは、メタノールで抽出すると水試料の回収率 97.1%、並行精度 5.6%と良好な結果であり、マトリックス効果も 1.03 であり抽出操作による測定への影響はないと判断された。しかし、血液試料、尿試料の回収率はそれぞれ 32.7%、32.1%と低く、並行精度もそれぞれ 19.6%、15.1%であったことから、人体試料中濃度の正確な定量は困難であることが示唆された。マトリックス効果はそれぞれ 0.27、0.33 と低い値であり、回収率の低さは人体試料に含まれる成分によると考えられる。

これに対してアセトン抽出では、水試料、血液試料、尿試料すべての回収率が 0%であり、いずれのマトリックス添加標準溶液からもリナマリンを検出することはできなかった。よって、リナマリンの検出にアセトンは適用不可と判断した。

アミグダリンは、メタノールでの回収率は水試料 100.6%、血液試料 66.0%、尿試料 57.5%であり、並行精度はいずれも 5.0%以下であった。メタノール抽出でも、人体試料からの回収率が低かったが、マトリックス効果（それぞれ 0.99、0.59、0.55）によるものと考えられた。

アセトンでの回収率は水試料 111.3%、血液試料 82.3%、尿試料 57.1%であり、並行精度はそれぞれ 5.2%、2.4%、2.9%、マトリックス効果はそれぞれ 1.06、0.71、0.56 であり、メタノールより高感度に検出できることが示唆された。

尚、回収率真度をマトリックス効果で除した補正真度を表 13 に示した。リナマリンのアセトン抽出を除き、補正真度は 94.3~121.1%であった。人体試料中成分の他に、測定を妨害する要因はないと考えられる。

(8) ヒ素、鉛、亜鉛、6 価クロムの水質検査用簡易キットによる分析法の検討

8-1. 人体試料への適用可否の検討

①ヒ素

「1 mg/L ヒ素標準液（富士フィルム和光純薬（株））」を標準品及び添加試薬として用いた。

「パケットテスト ひ素（低濃度）セット」（型式：SPK-As(D)）付属のプロトコールに従い操作しヒ素標準溶液(0.01, 0.1, 1 ppm) を測定したところ、標準色と比較して概ね良好な結果が得られた（図 5-A,B,C）。

本キットのヒ素検出方法では、分析試料中のヒ素をフィルターに吸着させて呈色させるが、この際フィルターに高濃度のリン酸イオンが残留すると結果に大きな影響を与える。人工尿試料はリン酸イオンを多く含むことから、付属のプロトコールの注記に従い、ヒ素を捕集したフィルターの洗浄回数を追加した。人工尿のヒ素添加試料（1 ppm）は 1 ppm 相当の色調を呈したが、Blank 試料も 0.05~0.1 ppm 相当の色調を呈した（図 5_D,E）。低濃度域での信頼性は低くなるようだが、使用可能と判断した。

血液試料は、未処理ではヒ素捕集フィルターが目詰まりしてしまい操作困難であったため、超純水で 10 倍希釈後遠心分離(3000 rpm, 10 分間)し、上清を血液 Blank 試料とした。しかし、ヒ素捕集フィルターの目詰まりは解消されず、操作続行は困難であった。農薬分析と同様、2 倍量のメタノール

ール添加も検討したが、メタノールによりフィルターが変質してしまい、使用不可と判断した。

以上より、「パケットテスト ひ素（低濃度）セット」は人工尿試料については適用可能であるが、血液試料については使用不可と判断した。

②鉛

塩化鉛（試薬特級）を標準品及び添加試薬とした。

「パケットテスト 鉛セット」（型式：SPK-Pb）付属のプロトコールに従い操作したところ、塩化鉛 (II) 1 ppm 標準溶液（Pb として約 0.75 ppm）については良好な結果が得られた（図 6-A）。

人工尿試料について、塩化鉛無添加の人工尿を未処理で Blank 試料として測定したところ、0 ppm に相当する色調を呈した（図 6-B）。一方、血液試料については未処理での操作が困難であった。

超純水に 2 倍量メタノールを添加したものを試料とした結果、0 ppm と同様の色を呈した（図 6-C）。人工尿及び血液試料の塩化鉛無添加試料（Blank 試料）及び添加試料（1 ppm）に 2 倍量メタノールを添加し、遠心分離後上清を試料とした。人工尿試料では、Blank、添加試料の色調に差が出て良好な結果であったが（図 6-D, E）、血液試料では Blank、添加試料どちらも 0 ppm 相当の色調となり検出できなかった（図 6-F, G）。

パケットテストの適用は、人工尿試料については可能だが、血液試料については不可と判断した。

③亜鉛

塩化亜鉛（試薬特級）を標準品及び添加試薬とした。

「パケットテスト 亜鉛」（型式：WAK-Zn）付属の手順書に従って操作を行い、塩化亜鉛 1 ppm 標準溶液（Zn として 0.48 ppm）を測定したところ、良好な結果が得られた（図 6-A）。

人工尿試料について、塩化亜鉛無添加及び添加試料 (1 ppm) を未処理で測定したところ、良好な結果が得られた (図 7-B, C)。一方、血液試料は未処理での操作が困難であり使用できなかった。

人工尿及び血液の塩化亜鉛無添加及び添加試料 (1 ppm) に、2 倍量メタノールを添加し、遠心分離後上清を試料として測定を行ったが、人工尿、血液とも、塩化亜鉛添加試料と無添加試料の間に色調の差が出ず、検出不能と判断した。(図 7-D~G)。

以上より、人工尿 (前処理なし) には適用可能と判断した。

④6 価クロム

クロム酸カリウムを標準品及び添加試薬とした。

「パックテスト 6 価クロム」(型式:WAK-Cr⁶⁺) 付属の手順書に従って操作を行い、クロム酸カリウム 1 ppm 標準溶液 (Cr⁶⁺として 0.27 ppm) を測定したところ、良好な結果が得られた (図 8-A)。

人工尿試料について、無添加及び添加試料 (1 ppm) を作製して測定したが、呈色しなかった (図 8-B,C)。人工尿、血液試料共に、2 倍量メタノールを添加し、遠心分離後上清を試料として測定を行ったが検出不能であった (図 8-D~G)。未処理の人工尿 K₂CrO₄ 添加試料 (1 ppm) を、超純水で 3 倍希釈してから測定を試みたが、発色しなかった (図 8-H)。

以上、6 価クロムについては人工尿、血液試料どちらもパックテストによる検出は不可と判断した。

8-2. 固相抽出との組合せによる分析法の検討

血液試料は、多検体同時処理用器具での操作中、人体試料が器具内に飛散してしまうことが判明

したため、感染リスクの上昇を危惧し、本検討方法の使用は不可とした。

尿試料は、多検体同時処理用器具での操作中に試料が飛散することはなかった。鉛及び亜鉛は、固相抽出における溶出液が、パックテストの呈色を妨害することが判明し、使用不可と判断した。尿試料中のヒ素及び 6 価クロムの添加回収試験は以下の通りに実施した。

①前処理法

水又は人工尿試料は、使用直前に 40 °C の水浴で 10 分間加温してから用いた。水又は人工尿 250 µL をマイクロチューブにとり、1,000 µL の 100 mM 酢酸アンモニウム (pH 5.5) を加えヴォルテックスミキサーで 30 秒間攪拌した。12,000 ×g, 4 °C で分間遠心分離し、上清全量を、予め 3 mol/L 硝酸 5 mL、水 5 mL、100 mM 酢酸アンモニウム (pH 5.5) 5 mL でコンディショニングした InertSep ME-2 カラム (30 mg/1 mL) に負荷し、通過液を回収した。遠心分離後沈殿に 500 µL の 100 mM 酢酸アンモニウムを加えヴォルテックスミキサーで 30 秒間攪拌した。12,000 ×g, 4 °C で分間遠心分離し、上清全量を、上の InertSep ME-2 カラムに負荷し、通過液を回収し 1 回目通過液と合わせた。InertSep ME-2 カラムを 100 mM 酢酸アンモニウム (pH 5.5) 1 mL で洗浄した後、3 mol/L 硝酸 2 mL と 1 mL で順次溶出し、溶出液を合わせた。

②分析試料

水または人工尿にヒ素又は 6 価クロムを 10 µg/mL (= 10 ppm) となるよう添加したものを人体試料とした。ヒ素の分析には、InertSep ME-2 の通過液に水を加え 30 mL に定容したものを試料溶液とした。6 価クロムの分析には、InertSep ME-2 の溶出液に水を加え 5 mL に定容したものを試料溶液とした。(水は空試験。)

対象重金属を添加しない人工尿を同様に前処理して得た通過液（ヒ素）または通過液（6価クロム）に、ヒ素又は6価クロムの標準溶液（100 mg/L）25 µLを加え水で定容したものを人工尿マトリックス標準溶液とした。各試料中の金属濃度は、絶対検量線法により求めた。

③比色分析

定量分析には、パックテストヒ素（低濃度）又はパックテスト6価クロム、並びにパックテスト専用の分光光度計、デジタルパックテスト・マルチSPを用いた（いずれも共立理化学研究所製）。

④添加回収試験

ヒ素の水試料からの回収率は100.8%であったが、並行精度は17.3%と良好でなかった（表14）。尿試料からの回収率は123.3%と水試料より高い値だったが、マトリックス効果は1.26であり、補正回収率は97.9%と、並行精度5.0%と合わせて良好な結果判断した。

6価クロムの本検討方法による水試料からの回収率は42.7%と低かった（表14）。尿試料からの回収率は25.3%とさらに低く、マトリックス効果0.79で補正しても32.0%であった（表14）。

8-3. 有機溶媒での抽出法との組合せによる分析法の検討

血液試料を固相抽出で精製できなかつたため、農薬やシアン配糖体の分析における前処理方法の改変を、ヒ素を対象として試みた。

①前処理法

水又は血液試料は、使用直前に40℃の水浴で10分間加温してから用いた。水又は血液250 µLをマイクロチューブにとり2倍量（500 µL）のメタノールを加えヴォルテックスミキサーで20秒間攪拌した後、冷蔵庫（4℃）で10分間静置した。

12,000×g, 4℃で10分間遠心分離し、上清を全量、ナスフラスコに移した。ロータリーエバポレーターで濃縮乾固した後、水29 mLを加え、1分間の超音波処理後、ポア径0.45 µmのシリンジフィルターでろ過したものを水で29 mLに定容し、パックテストの試料溶液とした。

②分析試料

水又は血液にヒ素10 µg/mLとなるよう添加したものを前処理し、得た溶液を添加回収試験試料とした（水は空試験）。各試料中のヒ素濃度は、絶対検量線法により求めた。

③比色分析

定量分析には、パックテストヒ素（低濃度）、及びデジタルパックテスト・マルチSPを用いた。

④添加回収試験

血液250 µLに2倍量のメタノールを加え、遠心分離後の上清をロータリーエバポレーターで減圧留去し溶媒を除去した後、残渣を29 mLの水に溶解する方法を考案し検討したが、水試料からの回収（空試験）でさえ回収率77.5%、並行精度19.2%と良好でなく、血液試料からの回収率は19.3%、並行精度は22.5とさらに不良な結果となった（表15）。なお、溶媒留去後に加えた水の量（29 mL）は、パックテストの仕様に基づいて設定した。

(9) ヒ素、鉛、6価クロムのICP-MS分析法の検討

①前処理法

水又は人工尿試料は、使用直前に40℃の水浴で10分間加温してから用いた。水又は人工尿200 µLを石英製分解容器に量りとり、硝酸（1.42）5 mL、過酸化水素水2 mLを加えた。試料を含む石英製分解容器をTFM製分解容器に入れ、マイク

ロ波分解装置で分解した。放冷後、試料溶液をポリプロピレン製容器に移し、内部標準溶液を加え、水で 50 mL に定容し試料溶液として ICP-MS 分析に供した。

②分析試料

ヒ素、鉛、6 価クロムを含む金属混合標準溶液無添加の水、血液試料、又は人工尿試料を前処理して得た試料溶液をブランク試料とし、ブランク試料の調製途中で金属混合標準溶液を各 4 ng/mL となるよう添加したものをマトリックス標準溶液とした。

水、血液試料、又は人工尿試料に金属混合標準溶液を各 100 ng/mL となるよう添加したものを前処理し、得た溶液を添加回収試験試料とした（水は空試験）。各試料中の農薬濃度は、内部標準法により求めた。

ヒ素は、水試料、血液試料、尿試料のブランク試料からそれぞれ 0.7、0.9、0.3 ng/mL と極微量検出されたため、添加回収試験試料及びマトリックス添加標準溶液の測定値からブランク試料の濃度を引いた値を分析値とした。水試料（空試験）からの回収率は 99.7%、並行精度 3.5% であり、血液試料からは回収率 102.7%、並行精度 3.1%、尿試料からは回収率 102.2%、並行精度 3.1% と良好な結果であった（表 16）。マトリックス効果は 1.14～1.21 であり、わずかに感度が増強される傾向が認められた。

鉛は、水試料、血液試料、尿試料のブランク試料からそれぞれ 3.3、54.6、6.9 ng/mL の濃度で検出されたため、添加回収試験試料及びマトリックス添加標準溶液の測定値からブランク試料の濃度を引いた値を分析値とした。水試料（空試験）からの回収率は 98.2%、並行精度 2.7% であり、血液試料からは回収率 93.6%、並行精度 10.2%、尿

試料からは回収率 94.2%、並行精度 3.4% であり、血液試料の並行精度が不良であった（表 16）。マトリックス効果は 1.10～1.13 であり、わずかに感度が増強される傾向が認められた。

6 価クロムは、水試料、血液試料、尿試料のブランク試料からそれぞれ 1.9、4.4、5.6 ng/mL の濃度で検出されたため、添加回収試験試料及びマトリックス添加標準溶液の測定値からブランク試料の濃度を引いた値を分析値とした。水試料（空試験）からの回収率は 101.7%、並行精度 5.9% であり、血液試料からは回収率 98.8%、並行精度 6.1%、尿試料からは回収率 94.9%、並行精度 8.2% であり、並行精度がヒ素、鉛より高かった（表 16）。マトリックス効果は 1.10～1.13 であり、わずかに感度が増強される傾向が認められた。

D. 考察

(1) 有機リン系農薬 6 種の HPLC 分析法の検討

本報告では、ODS カラムを用いた分析のみ記載した。代謝物のジメチルリン酸等、高極性農薬については HILIC カラム等、別の LC 分析条件を検討せねばならない。

HPLC による分析法では前処理をせず、検出限界を尿中濃度 0.25 µg/mL (≒ 250 ppb) と判断した。

(2) 有機リン系農薬 8 種及び代謝物の LC-MS/MS 分析法の検討

回収率が試料中濃度に依存する可能性、及び日間変動が比較的大きい可能性が示唆された。添加濃度の設定値を増やし、試行回数を増やすことでこれらの要因について詳細な検討が必要と考える。

尚、ある農薬が血中に 50 ng/mL の濃度で検出さ

れた場合に、どの程度経口摂取したことになるか、考察する。成人の循環血液量は体重の約 1/13 に相当すると言われている。体重 60kg なら血液 4.6 kg \approx 4.4 L となるので、血中農薬濃度が 50 ng/mL ならば

$$50 \text{ [ng/mL]} \times 4.4 \text{ [L]} = 220 \text{ [\mu g]}$$

が全身の血液中に存在することになる。経口摂取した農薬の 10% が吸収され、さらに 90% が代謝され残り 10% が親化合物として残る場合、

$$220 \text{ [\mu g]} \div 10 \text{ [%]} \div 10 \text{ [%]} = 22 \text{ [mg]}$$

を経口摂取したと概算できる。現実的には、農薬毎に吸収率、分布・代謝の様式等が異なるうえ、吸収・代謝のそれぞれに時間の要因も加わるため、より複雑な考察が必要になる。また尿に関しては、吸収・分布・代謝に加え排泄に関する知見も必要となるため、人体試料から摂取した農薬の量を推定するのは難しい。とはいえ、農薬摂取による症状の軽重は濃度に依存するため、人体試料中の農薬濃度、特に血中濃度が算出できる方法は非常に有意義である。

(3) 有機リン系農薬 56 種の LC-MS/MS 分析法の検討

本法により、検討対象とした 56 成分中 47 成分が人体試料から検出可能であったが、回収率の低い農薬もあった。回収率が低下した原因として、アルブミン等血漿中タンパクへの吸着等相互作用の可能性が考えられる。血漿中タンパクの量は生活習慣や既往歴により個人差が大きく、また食品テロ発生直前に喫食したものによっては、血糖値や中性脂肪量も大きく変動し、抽出効率、回収率に影響を及ぼす可能性が高い。本研究で用いた血液試料は市販のヒト全血試料 1 種類のみであり、添加回収試験は 1 日、1 機関でのデータのみであ

る。今後、由来の異なる血液試料についても添加回収試験を実施しデータを収集し、必要に応じて抽出法の改良を検討する。

(4) 有機リン系農薬の簡易検出キットによる分析

本検討で用いたキットで検出感度 1 ppm と保証されている農薬については、血液試料及び尿試料から検出可能と考えられる。ただし、本キットで検出感度が明記されていない有機リン系農薬の検出感度の確認は必要である。また、より高感度の検出が可能となるよう、抽出法または呈色方法の改良検討は必要と考えられる。

(5) カーバメート系農薬 17 種の LC-MS/MS 分析法の予備検討

本法により、検討対象とした 17 成分中 16 成分が人体試料から検出可能であったが、回収率の低い農薬もあった。回収率が低下した原因として、有機リン系農薬と同様、アルブミン等血漿中タンパクへの吸着等相互作用の可能性が考えられ、由来の異なる血液試料からの添加回収試験、抽出法の改良等が課題と考えられた。

(6) カーバメート系農薬 17 成分の LC-MS/MS 分析法の検討

メタノール抽出、アセトン抽出共に、血液試料中チオジカルブは不検出で、メソミル回収率は 164.1% 又は 200.0% であった。チオジカルブは、硫黄原子を介してメソミルが二量化した化合物であり (図 1)、チオジカルブは血中でメソミルに分解されることが強く示唆された。食品中の残留農薬試験法の公定法である個別試験法「チオジカルブ及びメソミル試験法 (農産物)」においても、

「チオジカルブ及びメソミルをメソミルオキシムに変換した後、(中略)メソミルに換算した値を分析値とする。」とあることから、チオジカルブを2分子のメソミルとして濃度換算し、メソミルの分析値との合算として算出した(表 10, 11、最下段)。この結果、回収率は85.7~104.4%となり良好な値となったが、血液試料、尿試料共に、メタノールはアセトンより回収率が低かった。また、血液試料からメソミルが検出された場合は、チオジカルブも原因物質として疑う必要があることも判明した。尚、尿試料中チオジカルブは検出されてはいるが、経口摂取された場合、血中ですべてメソミルに変換され、尿試料からは回収されないと考えられる。

チオジカルブをメソミルに換算して合算すると、メタノール抽出の回収率は血液13.4~103.7%、人工尿39.0~106.2%、アセトン抽出では血液92.1~133.9%、人工尿36.4~112.1%となる。アセトンの回収率がメタノールより高いのは、アセトンによるイオン化促進効果によると考えられる。これは、水試料のマトリックス効果が高いことから支持される。

本検討でのLC条件で保持時間が10分未満の農薬の回収率は良好であるが、10分以上のアラニカルブ、ベンフラカルブ、フラチオカルブ、カルボスルファンの回収率が低かった。水試料からの抽出でも回収率が低いことから、マイクロチューブや限外ろ過膜への吸着の可能性が考えられるが、人体試料からの抽出は水試料からの抽出より回収率が高くなった。特に、血液試料からアセトンで抽出すると回収率が飛躍的に高まったことから、緊急時の分析では、メタノールよりアセトンの使用が望ましいと考えられる。

(7) シアン配糖体のLC-MS/MS分析法の検討

①前処理法

水試料(空試験)、血液試料、尿試料から、メタノール又はアセトン抽出溶媒としてリナマリン及びアミグダリンの添加回収試験を実施した(表 12)。人体試料からのリナマリンの抽出にアセトンは使用不可であることが判明した。メタノールは抽出溶媒として使用可能であるものの、回収率は低く、並行精度も良好でなかったが、それは血液試料または尿試料中成分のマトリックス効果によるリナマリンの分解、又はイオン化抑制によるものであり、補正回収率が121.1%、97.3%であることから(表 13)、その他に測定を妨害する要因はないと考えられる。よって、人体試料中500 ng/mL程度であれば、メタノール抽出によりリナマリンを検出可能と判断した。

一方、人体試料中のアミグダリンは、アセトン、メタノールどちらでも抽出可能であった(表 12)。絶対検量線法による回収率は57.1~82.3%と低めであったが、マトリックス効果も0.55~0.71であり、リナマリンより影響は小さいものの、血液試料または尿試料中成分のマトリックス効果によるリナマリンの分解、又はイオン化抑制が起こっていると推測される。並行精度、補正真度は良好であり、人体試料中500 ng/mL程度であれば、メタノールまたはアセトン抽出によりアミグダリンを検出可能と判断した。

以上、シアン配糖体であるリナマリン及びアミグダリンを、血液・尿等人体試料から検出する方法を検討し、人体試料中500 ng/mLであれば検出可能な方法を確立したが、リナマリンはアセトンで検出不可であることが判明したため、両成分を同時に分析する必要がある場合はメタノール使用が望ましいと判明した。

(8) ヒ素、鉛、亜鉛、6価クロムの水質検査用簡易キットによる分析法の検討

8-1. 人体試料への適用可否の検討

ヒ素、鉛、亜鉛、6価クロムの4種についてパックテストを用いた測定方法を検討した。尿試料についてはヒ素、鉛、亜鉛が検出可能であったが、6価クロムは検出不可であった。また、ヒト全血では、4種すべて検出不可であった。

クロムについては、6価クロムを摂取しても体内または人体試料中で即座に3価に変換される可能性が高い。本研究では6価クロム検出用パックテストを検討したが、総クロム検出用パックテストについても検討する必要がある。

使用するパックテストによって、手順の煩雑さや溶媒耐性等が異なるため、操作手順の確認は十分に行う必要がある。また、検水中の共存物質の影響を受けることが注記されており、人体試料にはリン酸イオンやアンモニウムイオン等各種イオンをはじめ、金属やタンパクが多数含まれている。血液試料へのパックテストの適用は困難であるが、尿試料は前処理方法を最適化することで、より高感度な検出の実現可能性がある。加えて、農薬と同様、パックテストとICP-MS等の高精度の分析法を組み合わせることが重要であるとも考えられる。

8-2. 固相抽出との組合せによる分析法の検討

ヒ素は、尿試料からの回収率が水試料からの回収率より高かったが、これは、ヒ素検出用パックテストの原理上、リン酸イオンも呈色してしまうことに依る(表14)。補正回収率は97.9%であり数値としては良好ではあるが、添加濃度が10ppmと高い。パックテストではこの濃度が限度である

ため、より低濃度でも検出できる方法の確立が望ましい。6価クロムは本検討方法で検出できたものの、回収率が25.3%、マトリックス効果で補正しても32.0%と低く、改善が必要であった。

8-3. 有機溶媒での抽出法との組合せによる分析法の検討

本検討方法にて、水試料、血液試料からヒ素を検出できたものの、回収率は77.5%、19.3%と低かった(表15)。また、並行精度が両試料とも20%前後であり、分析値のばらつきが非常に大きかった。これには、ロータリーエバポレーターでの濃縮操作が一因として考えられる。非常事態時の操作ということを考慮し、ロータリーエバポレーターを使用しない方法を確立し、回収率及び並行精度を向上させる必要があると判断した。

(9) ヒ素、鉛、6価クロムのICP-MS分析法の検討

ICP-MSを用いることで、ヒ素、鉛、6価クロムを100ng/mLの濃度で添加した水試料、血液試料、尿試料から、回収率93.6~102.7%、並行精度2.7~10.2%で対象金属を検出できた(表16)。また、回収率をマトリックス効果で除した補正回収率は表17に示した。金属3種、試料3種合わせて84.1~90.0%の回収率であり、人体試料中100ng/mLのヒ素、鉛、6価クロムは十分に検出可能であると判断された。

本検討方法において、試料調製にかかる時間は1試料あたり約10分、マイクロ波分解に36分、分解後放冷に1時間、ICP-MSの分析時間は1試料あたり15分であり、合計すると約2時間となる。テロ等の緊急事態における原因物質究明という目的からすると、放冷時間を短縮するなど、よ

り短時間で分析結果を得られるよう、改善する必要がある。

ブランク試料の分析において、ヒ素は 0.3~0.9 ng/mL、6 価クロムは 1.9~5.6 ng/mL 検出されたのに対し、鉛の水試料、尿試料中濃度は 3.3、6.9 ng/mL であったが血液試料中濃度は 54.6 ng/mL と他の試料より高濃度で検出された。臨床的知見として、血中鉛濃度が 10 µg/dL (= 100 ng/mL) 程度から、ヘム合成に関わる δ-アミノレブリン酸脱水酵素 (ALAD) 活性の阻害が生じ、50~80 µg/dL 以上になると倦怠感、胃腸障害、抹消神経障害が出るとされている (出典: 「臨床検査項目辞典」医歯薬出版株式会社)。テロ事件等の被害者の普段の生活状況によって、血中鉛濃度は高めに出る可能性があること、及び個人差が大きい可能性に留意すべきと考えられる。

尚、亜鉛は、装置の原理上本検討における濃度範囲では正確な定量が不可能であったため、検出できることは確認したが、定量評価はしなかった。

E. 結論

食品テロ等の毒物等混入事件が発生した場合、地方衛生研究所 (地衛研) 等が、原因物質究明のために被害者の血液・尿等人体試料の検査も迅速に行うことができるよう、有機リン系農薬、カーバメート系農薬、シアン配糖体、並びにヒ素等重金属 4 種について分析法を検討し、本分担研究の成果として、図 9 に示す分析法フローチャートを作成した。

有機リン系農薬、カーバメート系農薬、シアン配糖体は、LC-MS/MS による分析法を開発した。これらの前処理方法は同一であるため、事件発生時に試料調製にかかる時間は短縮できた。一方、LC-MS/MS 条件は化合物群ごとに最適化されてい

るので、LC-MS/MS 条件を統合し、汎用性を高めることが今後の課題である。抽出法から分析条件まで統合できれば、意図的・非意図的に関わらず、食中毒発生時の原因物質究明に役立つと期待される。

重金属のうち、ヒ素、鉛、6 価クロムは ICP-MS を用いる分析法を検討した。毛髪等、他の人体試料中の金属分析等で既に実績のある分析法であり、血液・尿等人体試料にも問題なく適用できることを確認できた。しかしながら、試料調製に時間がかかるため、調製時間の短縮が今後の課題である。

有機リン系農薬及びヒ素等重金属について、比色法を利用した市販の簡易キットを使用しての分析法開発にも着手したが、回収率の低さ、定量限界の高さ等の理由から極めて困難であった。比色法を利用するにしても新たな原理とそれに基づく分析法の開発が、今後の課題と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 田口貴章、山下涼香、成島純平、岸美紀、赤星千絵、岡部信彦、穂山浩. 食品テロ対策のための LC-MS/MS による血液・尿等人体試料中の有機リン系農薬の一斉分析法の検討. 日本食品化学学会誌. Vol. 27(1), 33-39, 2020

2. 学会発表

1) 田口貴章、成島純平、穂山浩. 食品テロ対策のための人体試料(血液・尿等)中の有機リン系農薬の定量評価法検討. 日本薬学会レギュラトリーサイエンス部会 第 5 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム. 2019 年 9 月 14 日. 東京

2) 田口貴章、山下涼香、岸美紀、赤星千絵、岡部

信彦、穂山浩. 食品テロ対策のための人体試料(血液・尿等)中のカルバメート系農薬の分析法検討. 日本食品衛生学会 第 115 回食品衛生学会学術講演会. 2019 年 10 月 4 日. 東京

3) 田口貴章、山下涼香、岸美紀、赤星千絵、岡部信彦、穂山浩. 食品テロ対策のための人体試料(血液・尿等)中の有機リン系農薬の分析法検討. 全国衛生化学技術協議会. 2019 年 12 月 4 日. 広島

4) 田口貴章、難波樹音、山下涼香、岸美紀、赤星千絵、岡部信彦、穂山浩. 食品テロ対策のための LC-MS/MS による血液・尿等人体試料中のカーバメート系農薬の一斉分析法の検討. 日本食品衛生学会 第 116 回食品衛生学会学術講演会. 2020 年 11 月 29 日. 長崎 (Web 開催)

3. その他

本分担研究課題の成果物である論文等は、国立医薬品食品衛生研究所のホームページに新たに開設した「食中毒時の人体試料等検査に関する情報」ページにて公開し、関係各所に周知し

た。当該 HP のアドレスは以下である。
<http://www.nihs.go.jp/food/group3/JintaiShiryouKensaJouhou/JintaiShiryouKensaJouhou.html>

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

表 1. 人工尿の組成

尿素	25.0 g
塩化ナトリウム	9.0 g
りん酸水素二ナトリウム (無水)	2.5 g
塩化アンモニウム	3.0 g
りん酸二水素カリウム	2.5 g
クレアチニン	2.0 g
亜硫酸ナトリウム (無水)	1.5 g
蒸留水	1.0 L

表 2. 有機リン系農薬 8 種及び代謝物の LC-MS/MS 分析法の検討における
血液試料への添加回収試験結果

農薬等	血中濃度 10 ng/mL				検量線 r^2	試料中濃度 平均 (ng/mL)	回収率 真度 (%)	並行精度 (RSD %)
	検量線 r^2	試料中濃度 平均 (ng/mL)	回収率 真度 (%)	並行精度 (RSD %)				
MMP	0.998	1.91	57.9	1.7				
AP	0.997	2.17	65.8	1.9				
Dmet	0.998	1.31	39.7	6.8				
DDVP	0.996	0.00	0.0	-				
MLX	0.997	1.38	41.7	2.8				
MLT	0.997	1.92	58.1	3.2				
MEP	0.951	0.59	17.9	90.9				
EDDP	0.997	1.05	31.9	2.2				
PTF	0.987	0.00	0.0	-				
農薬等	血中濃度 50 ng/mL ①				血中濃度 50 ng/mL ②			
	検量線 r^2	試料中濃度 平均 (ng/mL)	回収率 真度 (%)	並行精度 (RSD %)	検量線 r^2	試料中濃度 平均 (ng/mL)	回収率 真度 (%)	並行精度 (RSD %)
MMP	0.993	18.4	110.4	0.4	0.998	16.4	98.5	1.0
AP	0.990	19.0	113.9	0.8	0.998	17.1	102.7	0.7
Dmet	0.993	16.4	98.4	0.4	0.997	15.5	93.0	0.9
DDVP	0.993	14.4	86.1	0.7	0.998	12.5	75.0	1.6
MLX	0.993	17.2	102.8	1.2	0.997	15.8	94.6	1.5
MLT	0.994	19.9	118.9	0.6	0.998	15.6	93.4	4.0
MEP	0.983	16.5	98.7	2.0	0.984	14.3	85.6	5.7
EDDP	0.993	16.5	98.5	0.7	0.997	14.0	84.0	2.5
PTF	0.964	12.3	73.5	12.0	0.847	7.4	44.3	44.2

塗潰し: $r^2 < 0.99$, 試料中濃度 = 0, 回収率 < 80%, 又は RSD > 2%

表 3. 有機リン系農薬 8 種及び代謝物の LC-MS/MS 分析法の検討における
尿試料への添加回収試験結果

農薬等	人口尿中濃度 10 ng/mL ①				人口尿中濃度 10 ng/mL ②			
	検量線 r^2	試料中濃度 平均 (ng/mL)	回収率 真度 (%)	並行精度 (RSD %)	検量線 r^2	試料中濃度 平均 (ng/mL)	回収率 真度 (%)	並行精度 (RSD %)
MMP	0.996	2.81	85.3	0.5	0.997	2.90	88.0	1.0
AP	0.993	2.16	65.3	1.1	0.997	2.89	87.5	0.8
Dmet	0.994	2.48	75.2	1.1	0.997	2.87	87.1	1.2
DDVP	0.992	2.20	66.5	1.2	0.997	2.53	76.6	5.5
MLX	0.993	1.85	55.9	1.6	0.996	2.55	77.2	1.3
MLT	0.994	2.06	62.3	1.3	0.997	2.59	78.5	1.7
MEP	0.992	2.65	80.2	12.4	0.989	2.63	79.8	7.9
EDDP	0.993	2.04	61.9	2.4	0.997	2.50	75.8	2.5
PTF	0.980	3.37	102.1	11.2	0.940	2.77	84.0	13.5

農薬等	人口尿中濃度 50 ng/mL ①				人口尿中濃度 50 ng/mL ②			
	検量線 r^2	試料中濃度 平均 (ng/mL)	回収率 真度 (%)	並行精度 (RSD %)	検量線 r^2	試料中濃度 平均 (ng/mL)	回収率 真度 (%)	並行精度 (RSD %)
MMP	0.996	17.6	105.3	0.6	0.997	16.7	99.9	0.8
AP	0.993	17.6	105.5	0.4	0.997	17.7	106.0	0.3
Dmet	0.994	17.7	105.8	0.7	0.997	17.6	105.5	0.5
DDVP	0.992	16.4	98.3	0.5	0.997	16.9	101.4	1.7
MLX	0.993	16.1	96.5	0.4	0.996	16.6	99.5	0.7
MLT	0.994	16.7	99.9	0.8	0.997	16.8	100.6	0.9
MEP	0.992	17.1	102.3	3.5	0.989	16.4	98.3	3.4
EDDP	0.993	16.2	96.7	1.1	0.997	15.7	94.3	1.2
PTF	0.980	12.5	74.9	8.3	0.940	11.9	71.4	10.8

塗潰し: $r^2 < 0.99$ 、試料中濃度 = 0、回収率 < 80%、又は RSD > 2%

表 4. 有機リン系農薬 8 種及び代謝物の LC-MS/MS 分析法の検討における
各農薬の定量限界及び検出限界（血中濃度または人工尿中濃度として）

	血中濃度 (ng/mL)			人工尿中濃度 (ng/mL)	
	定量限界	検出限界		定量限界	検出限界
MMP	50	10	MMP	50	10
AP	50	10	AP	50	10
Dmet	-	10	Dmet	50	10
DDVP	50	50	DDVP	50	10
MLX	50	10	MLX	50	10
MLT	50	10	MLT	50	10
MEP	-	10	MEP	50	10
EDDP	50	10	EDDP	50	10
PTF	-	50	PTF	-	10

注: 1 ng/mL ≒ 1 ppb

表 5. 有機リン系農薬 56 種の LC-MS/MS 分析法の検討において検出された
有機リン系農薬 47 種の MS/MS 分析条件

	定量イオン				定性イオン			
	Precursor (<i>m/z</i>)	Product (<i>m/z</i>)	CV ^a (V)	CE ^b (V)	Precursor (<i>m/z</i>)	Product (<i>m/z</i>)	CV ^a (V)	CE ^b (V)
methamidophos	141.9	93.9	30	12	141.9	124.8	30	14
acephate	183.9	142.8	20	10	183.9	94.6	20	25
omethoate	214.0	182.8	25	10	214.0	124.8	25	22
monocrotophos	224.1	127.1	30	15	224.1	109.0	30	10
vamidothion	288.0	146.0	25	10	288.0	118.0	25	25
dimethoate	230.0	198.8	20	10	230.0	124.8	20	22
dichlorvos	221.0	109.0	23	22	221.0	79.0	23	34
fosthiazate	284.0	104.0	19	22	284.0	228.0	19	10
fenusulfthion	309.0	157.1	36	25	309.0	173.1	36	22
methidathion	303.0	84.9	30	20	303.0	144.8	30	10
azinphos-methyl	318.1	132.0	8	20	318.1	160.1	8	8
phosmet	318.0	160.0	28	22	318.0	77.0	28	46
fenamiphos	304.1	217.1	27	24	304.1	202.1	27	36
dimethylvinphos (Z)	331.0	127.1	30	19	331.0	170.1	30	47
dimethylvinphos (E)	331.0	127.1	30	19	331.0	170.1	30	47
pyridaphenthion	341.0	189.0	31	22	341.0	92.0	31	34
etoprophos	243.0	131.0	18	20	243.0	97.0	18	31
malathion	331.0	126.9	30	12	331.0	98.9	30	25
iprobenfos	289.0	91.0	9	20	289.0	205.0	9	10
azinphos-ethyl	346.0	77.1	16	36	346.0	132.0	16	16
edifenphos	311.0	109.0	23	32	311.0	111.0	23	26
chlorfenvinphos (α)	358.9	155.0	28	12	358.9	99.0	28	30
chlorfenvinphos (β)	358.9	155.0	28	12	358.9	99.0	28	30
quinalphos	299.0	162.9	15	24	299.0	96.9	15	30
pyraclofos	361.1	111.1	30	85	361.1	138.1	30	55
fenthion	279.0	168.9	25	18	279.0	104.9	25	25
phenthoate	321.0	79.1	9	40	321.0	135.0	9	20
etrimfos	293.1	125.0	29	26	293.1	265.1	29	16
pirimiphos-methyl	306.1	107.9	30	30	306.1	67.1	30	40
coumaphos	363.0	307.0	32	16	363.0	289.0	32	24
diazinon	305.1	169.0	20	22	305.1	96.9	20	35
cadusafos	271.1	159.0	16	16	271.1	131.0	16	22
cyanofenphos	304.0	276.0	34	12	304.0	157.0	34	22
tolclofos-methyl	300.9	124.9	30	16	300.9	268.9	30	16
phosalone	367.9	181.9	12	14	367.9	110.9	12	42
phorate	261.0	75.1	15	12	261.0	97.1	15	25
chlorpyrifos-methyl	321.8	125.0	34	20	321.8	289.9	34	16
isoxathion	314.1	104.9	31	14	314.1	96.9	31	35
butamifos	333.1	180.0	2	10	333.1	95.9	2	34
EPN ^c	324.0	157.0	22	25	324.0	296.0	22	14
isofenphos	346.1	245.1	16	12	346.1	217.0	16	22
profenofos	372.9	302.6	30	20	372.9	127.9	30	40
terbufos	289.0	103.0	18	8	289.0	57.2	18	22
chlorpyrifos	350.1	97.0	25	33	350.1	197.9	25	19
ethion	385.0	199.0	30	10	385.0	142.9	30	25
sulprofos	323.1	219.0	10	14	323.1	247.0	10	10
prothiofos	345.1	240.9	2	18	345.1	268.9	2	10

a: Cone Voltage,

b: Collision Energy,

c: *O*-ethyl *O*-4-nitrophenyl phenylphosphonothioate の略称

表 6. 有機リン系農薬 56 種の LC-MS/MS 分析法の検討における

血液試料及び人工尿試料のマトリックス効果並びに添加回収試験における回収率

	マトリックス効果 (%) ^a				回収率 (%) ^b			
	血液		人工尿		血液		人工尿	
	Day 1	Day 2	Day 1	Day 2	50 ^c	10 ^c	50 ^c	10 ^c
methamidophos	130.4	119.7	132.0	95.7	112.4	101.8	102.7	99.4
acephate	44.1	35.3	105.8	83.4	87.9	N.D. ^c	105.4	107.0
omethoate	116.0	138.8	102.3	100.2	136.4	126.0	110.0	111.2
monocrotophos	136.6	171.1	109.2	121.7	142.0	133.0	109.1	111.9
vamidothion	125.8	143.9	107.6	111.1	132.6	123.9	110.4	112.4
dimethoate	114.7	150.2	124.4	130.2	125.3	112.4	109.8	113.4
dichlorvos	119.5	146.9	121.7	138.6	101.7	87.9	102.2	103.1
fosthiazate	126.8	137.2	137.9	135.4	104.5	99.4	108.7	108.3
fensulfenthion	125.2	104.6	126.2	114.1	107.2	98.3	107.0	101.6
methidathion	102.4	105.3	124.3	105.4	91.9	80.5	109.5	99.4
azinphos-methyl	94.2	109.8	99.2	99.2	77.8	49.5	101.2	70.9
phosmet	95.5	65.9	50.6	9.5	44.2	45.6	N.D. ^c	N.D. ^c
fenamiphos	116.8	124.1	113.5	122.7	108.6	103.6	103.3	101.3
dimethylvinphos (Z)	110.8	107.0	120.5	114.0	83.8	79.9	95.0	90.8
dimethylvinphos (E)	123.2	105.9	133.1	110.9	83.9	78.1	94.0	88.0
pyridaphenthion	104.2	113.1	111.8	118.0	86.7	85.1	97.6	91.3
etoprophos	148.0	155.5	161.7	169.7	116.9	106.0	106.8	108.8
malathion	106.2	108.6	119.0	107.6	88.0	88.6	96.6	92.7
iprobenfos	117.4	145.4	138.5	149.4	104.2	94.7	100.5	98.8
azinphos-ethyl	78.8	108.4	100.3	102.6	85.0	77.1	100.4	84.5
edifenphos	113.2	121.7	124.7	125.3	89.0	84.8	88.4	86.9
chlorfenvinphos (α)	118.4	119.7	128.3	124.8	87.5	83.5	84.9	78.5
chlorfenvinphos (β)	113.3	120.9	128.9	124.9	83.7	78.9	75.9	69.3
quinalphos	110.5	77.2	124.3	131.0	163.0	155.7	84.4	90.8
pyraclofos	133.4	138.4	126.4	125.6	86.1	85.3	74.6	66.3
fenthion	107.2	119.0	155.8	137.3	82.9	68.1	77.8	76.2
phenthoate	114.4	106.1	126.0	110.5	89.4	79.2	83.5	85.0
etrimfos	121.2	129.0	137.1	139.6	99.3	88.9	94.3	94.1
pirimifos-methyl	105.9	127.7	122.5	131.2	91.2	84.2	74.5	75.6
coumaphos	101.9	120.2	112.7	124.3	85.3	72.9	79.7	77.7
diazinon	110.5	129.5	127.9	134.1	97.7	90.3	84.9	85.3
cadusafos	124.3	159.1	154.0	162.0	103.4	96.4	93.8	95.1
cyanofenphos	119.6	120.0	130.0	125.5	84.0	61.3	69.9	65.7
tolclofos-methyl	139.1	107.7	160.2	121.4	97.7	69.2	60.9	N.D. ^c
phosalone	96.2	116.3	128.1	129.4	75.4	71.0	68.2	64.6
phorate	124.4	134.2	170.1	148.5	100.0	73.4	68.2	64.6
chlorpyrifos-methyl	99.5	113.3	131.9	113.4	74.4	59.9	59.6	47.4
isoxathion	99.1	117.2	102.0	116.4	93.2	91.7	72.2	73.0
butamifos	92.7	105.0	114.2	117.2	85.8	80.2	75.2	74.3
EPN	112.4	86.4	146.1	104.2	79.9	N.D. ^c	66.1	N.D. ^c
isofenphos	25.1	35.5	129.2	123.1	85.4	71.3	97.4	90.7
profenofos	101.4	93.3	125.3	129.8	82.5	66.4	65.8	64.8
terbufos	114.5	108.5	168.7	122.1	88.7	61.2	70.7	58.6
chlorpyrifos	135.4	116.8	159.7	117.2	68.1	65.1	60.1	32.2
ethion	96.5	141.1	134.5	145.2	82.9	77.0	55.6	58.7
sulprofos	93.1	106.6	116.3	112.3	66.5	65.8	58.2	57.8
prothiofos	240.2	93.1	273.8	78.5	— ^e	N.D. ^c	— ^e	N.D. ^c

a: マトリックス標準溶液中のピーク面積値 / 溶媒標準溶液中のピーク面積値. b: 試料溶液中のピーク面積値 / マトリックス標準溶液中のピーク面積値. c: 血液、尿等人体試料中濃度 [ng/mL]. d: N. D. = not detected. e: prothiofos は回収率の算出対象外.

表 7. カーバメート系農薬 17 種の LC-MS/MS 分析法の予備検討において
検出されたカーバメート系農薬 17 種の MS/MS 分析条件

	定量イオン			
	Precursor (<i>m/z</i>)	Product (<i>m/z</i>)	CV ^a (V)	CE ^b (V)
oxanyl	237.0	72.0	15	10
methonyl	162.9	88.0	15	10
pirimicarb	239.1	72.0	25	20
metolcarb (MTMC)	166.1	108.9	24	10
thiodicarb	355.1	88.1	17	16
propoxur	210.1	110.9	15	12
bendiocarb	224.1	109.0	15	15
xylylcarb (MPMC)	180.1	123.0	22	10
carbaryl	202.0	145.0	30	10
macbal (XMC)	180.1	123.0	22	10
ethiofencarb	226.1	107.0	10	15
isoprocarb (MIPC)	194.1	95.1	25	15
fenobucarb (BPMC)	208.0	94.9	25	15
alanycarb	400.1	238.1	5	14
benfuacarb	411.1	195.0	5	23
furathiocarb	383.2	194.9	20	15
carbosulfan	381.0	118.0	40	22

a: Cone Voltage,

b: Collision Energy.

表 8. カーバメート系農薬 17 種の LC-MS/MS 分析法の予備検討における
血液試料及び人工尿試料のマトリックス効果並びに添加回収試験における回収率

	マトリックス効果 (%) ^a				回収率 (%) ^b			
	血液		人工尿		血液		人工尿	
	Day 1	Day 2	Day 1	Day 2	50 ^c	10 ^c	50 ^c	10 ^c
oxanyl	135.4	114.7	89.8	75.5	127.0	135.3	106.2	113.0
methonyl	99.3	128.0	90.3	88.6	150.5	163.3	118.0	115.1
pirimicarb	131.3	108.1	132.7	107.8	119.5	125.0	108.3	111.1
metolcarb (MTMC)	100.5	90.9	94.5	86.7	101.7	113.2	109.2	112.7
thiodicarb	80.9	19.1	87.8	69.8	N.D. ^d	N.D. ^d	90.8	77.5
propoxur	110.4	89.8	115.8	93.9	106.1	118.0	110.4	114.0
bendiocarb	115.5	91.4	114.3	91.8	107.1	116.1	112.9	119.1
xylylcarb (MPMC)	95.9	89.1	96.8	88.2	95.6	107.6	111.8	113.5
carbaryl	96.1	83.5	101.2	85.2	85.4	101.5	109.8	112.7
macbal (XMC)	94.5	86.5	100.2	89.8	95.8	185.8	111.0	112.2
ethiofencarb	102.7	85.3	111.8	86.0	102.2	116.5	104.2	112.1
isoprocarb (MIPC)	95.9	87.0	99.2	90.4	96.9	109.0	109.9	109.8
fenobucarb (BPMC)	105.2	94.6	110.3	92.4	88.1	100.2	106.5	105.9
alanycarb	114.1	103.3	120.5	99.2	84.8	86.9	70.1	8.6
benfuacarb	117.5	100.1	120.7	101.8	104.6	113.2	41.5	3.8
furathiocarb	114.1	85.1	121.4	92.9	37.9	37.7	45.5	4.9
carbosulfan	111.8	91.2	103.8	95.3	81.2	74.8	11.8	0.6

a: マトリックス標準溶液中のピーク面積値 / 溶媒標準溶液中のピーク面積値.

b: 試料溶液中のピーク面積値 / マトリックス標準溶液中のピーク面積値.

c: 血液、尿等人体試料中濃度 [ng/mL].

d: N. D. = not detected.

表 9. カーバメート系農薬 17 種の LC-MS/MS 分析法の検討における

カーバメート系農薬 17 種の定量イオンと保持時間等

	定量イオン (m/z)		保持時間 (分)	移動相強度比較 ^a
	Precursor	Product		
オキサミル	237.0	72.0	3.7	2.1
メソミル	162.9	88.0	3.9	1.9
メトルカルブ (MTMC)	166.0	109.0	6.5	1.5
プロボキスル	210.1	110.9	6.9	1.8
ベンダイオカルブ	224.1	109.0	7.0	2.4
カルバリル	202.0	145.0	7.3	7.1
チオジカルブ	355.1	88.1	7.4	3.8
MPMC	180.2	132.2	7.4	2.5
エチオフェンカルブ	226.1	107.0	7.6	3.8
XMC	180.3	123.2	7.6	1.9
ピリミカーブ	239.1	72.0	7.8	1.3
イソプロカルブ (MIPC)	194.1	95.1	8.0	1.8
フェノブカルブ (BPMC)	208.0	94.9	8.8	1.4
アラニカルブ	400.1	238.1	10.2	1.3
ベンフラカルブ	411.1	195.0	11.3	0.65
フラチオカルブ	383.3	195.2	11.4	2.7
カルボスルファン	381.0	118.0	13.5	0.85

a: 5 mM ギ酸アンモニウム含有水-メタノール系で作成した検量線の傾きを、0.1% ギ酸含有水-アセトニトリル系で作成した検量線の傾きで除した値。
b: マトリックス標準溶液中のピーク面積値を溶媒混合標準溶液中のピーク面積値で除した値.

表 10. カーバメート系農薬 17 種の LC-MS/MS 分析法の検討における

人体試料中カーバメート系農薬のメタノール抽出による添加回収試験結果

	水			血液			尿		
	回収率 真度 (%)	並行精度 RSD (%)	マトリックス 効果	回収率 真度 (%)	並行精度 RSD (%)	マトリックス 効果	回収率 真度 (%)	並行精度 RSD (%)	マトリックス 効果
オキサミル	100.2	6.6	0.94	95.5	10.7	0.94	96.3	7.0	0.92
メソミル	104.1	9.6	0.91	164.1	8.3	1.66	119.5	10.4	1.02
メトルカルブ (MTMC)	102.0	7.8	0.93	99.9	16.6	1.05	105.1	8.5	1.02
プロボキスル	101.8	6.8	0.95	102.6	13.9	1.05	106.2	8.8	1.05
ベンダイオカルブ	97.8	7.6	0.94	94.7	13.2	1.03	97.1	7.7	1.00
カルバリル	101.6	7.8	0.96	98.1	17.0	1.05	104.1	8.5	1.03
チオジカルブ	92.5	9.7	0.95	0.0	-	0.04	53.2	10.5	0.73
MPMC	99.7	5.5	0.96	98.9	11.7	1.05	103.5	7.8	1.05
エチオフェンカルブ	99.1	7.5	0.92	99.0	12.5	1.04	95.5	3.7	1.02
XMC	100.1	5.8	0.97	100.1	9.8	1.06	103.2	6.9	1.06
ピリミカーブ	98.4	7.0	0.92	103.7	16.9	1.01	102.7	9.3	1.02
イソプロカルブ (MIPC)	99.9	6.2	0.98	98.0	13.6	1.03	104.0	8.6	1.04
フェノブカルブ (BPMC)	103.8	4.5	0.93	96.0	15.2	1.02	105.9	12.0	1.02
アラニカルブ	60.9	32.1	0.93	96.9	15.6	1.07	82.2	25.5	1.03
ベンフラカルブ	37.1	28.3	0.96	95.7	6.2	1.05	60.5	36.1	1.11
フラチオカルブ	42.0	30.6	0.98	13.4	37.0	0.78	52.1	19.8	1.03
カルボスルファン	16.6	9.6	1.05	66.8	21.9	0.92	39.0	33.3	1.06
メソミル+チオジカルブ ^a	98.6	9.6	-	85.7	8.3	-	87.8	9.9	-

a: チオジカルブ濃度をメソミル濃度に換算し、メソミル濃度と合算して算出した回収率.

表 11. カーバメート系農薬 17 種の LC-MS/MS 分析法の検討における

人体試料中カーバメート系農薬のアセトン抽出による添加回収試験結果

	水			血液			尿		
	回収率 真度 (%)	並行精度 RSD (%)	マトリックス 効果	回収率 真度 (%)	並行精度 RSD (%)	マトリックス 効果	回収率 真度 (%)	並行精度 RSD (%)	マトリックス 効果
オキサミル	109.4	8.2	1.17	116.7	5.4	1.15	103.1	7.1	1.05
メソミル	113.7	4.7	1.16	200.0	8.9	1.29	110.5	8.7	1.11
メトルカルブ (MTMC)	106.9	5.3	1.20	122.1	7.2	1.21	109.8	8.2	1.19
プロボキスル	108.8	6.1	1.21	123.7	6.8	1.22	109.8	6.6	1.20
ベンダイオカルブ	104.7	5.4	1.19	118.2	7.7	1.20	106.5	7.1	1.19
カルバリル	107.8	6.1	1.20	120.7	11.3	1.19	112.1	8.4	1.19
チオジカルブ	98.7	10.2	1.18	0.0	-	0.99	97.5	8.6	1.17
MPMC	105.5	5.6	1.22	122.9	5.1	1.21	108.5	6.9	1.20
エチオフェンカルブ	104.4	5.2	1.18	123.1	8.1	1.21	110.1	8.5	1.20
XMC	106.4	6.2	1.22	123.4	6.1	1.21	108.3	5.1	1.20
ピリミカーブ	102.4	5.2	1.17	125.2	8.6	1.18	107.0	11.7	1.18
イソプロカルブ (MIPC)	105.7	4.0	1.21	120.5	7.9	1.20	107.6	7.6	1.21
フェノブカルブ (BPMC)	110.1	7.2	1.17	120.9	5.4	1.25	107.9	9.8	1.26
アラニカルブ	70.2	26.9	1.21	122.4	17.0	1.14	88.2	15.2	1.16
ベンフラカルブ	38.3	35.4	1.24	133.9	14.2	1.13	64.1	49.8	1.16
フラチオカルブ	44.3	31.6	1.24	92.1	7.1	1.25	62.6	20.4	1.22
カルボスルファン	22.5	21.6	1.26	101.7	10.4	0.96	36.4	25.8	1.35
メソミル+チオジカルブ ^a	106.5	6.9	-	104.4	8.9	-	104.3	8.6	-

a: チオジカルブ濃度をメソミル濃度に換算し、メソミル濃度と合算して算出した回収率。

表 12. シアン配糖体の LC-MS/MS 分析法の検討における

人体試料中リナマリン及びアミグダリンの添加回収試験結果

抽出溶媒	化合物	水			血液			尿		
		回収率 真度 (%)	並行精度 RSD (%)	マトリックス 効果	回収率 真度 (%)	並行精度 RSD (%)	マトリックス 効果	回収率 真度 (%)	並行精度 RSD (%)	マトリックス 効果
メタノール	リナマリン	97.1	5.6	1.03	32.7	19.6	0.27	32.1	15.1	0.33
	アミグダリン	106.0	5.0	0.99	66.0	3.8	0.59	57.5	2.6	0.55
アセトン	リナマリン	0.0	-	0.00	0.0	-	0.00	0.0	-	0.00
	アミグダリン	111.3	5.2	1.06	82.3	2.4	0.71	57.1	2.9	0.56

表 13. シアン配糖体の LC-MS/MS 分析法の検討における

人体試料中リナマリン及びアミグダリンの補正回収率

抽出溶媒	化合物	補正回収率		
		水	血液	尿
メタノール	リナマリン	94.3	121.1	97.3
	アミグダリン	107.1	111.9	104.5
アセトン	リナマリン	-	-	-
	アミグダリン	105.0	115.9	102.0

表 14. ヒ素、鉛、亜鉛、6 価クロムの水質検査用簡易キットによる分析法の検討における
固相抽出とパックテストの組合せによるヒ素、クロムの添加回収試験結果

化合物	水			尿			
	回収率 真度 (%) ^a	並行精度 RSD (%) ^a	マトリックス 効果	回収率 真度 (%) ^a	並行精度 RSD (%) ^a	マトリックス 効果	補正回収率 (%)
ヒ素	100.8	17.3	-	123.3	5.0	1.26	97.9
6価クロム	42.7	5.4	-	25.3	9.1	0.79	32.0

表 15. ヒ素、鉛、亜鉛、6 価クロムの水質検査用簡易キットによる分析法の検討における
有機溶媒での抽出法との組合せによる血液試料からのヒ素の添加回収試験結果

化合物	水		血液	
	回収率 真度 (%) ^a	並行精度 RSD (%) ^a	回収率 真度 (%) ^a	並行精度 RSD (%) ^a
ヒ素	77.5	19.2	19.3	22.5

表 16. ヒ素、鉛、6 価クロムの ICP-MS 分析法の検討における
ICP-MS による人体試料中ヒ素、鉛、6 価クロムの添加回収試験結果

化合物	水			血液			尿		
	回収率 真度 (%) ^a	並行精度 RSD (%) ^a	マトリックス 効果	回収率 真度 (%) ^a	並行精度 RSD (%) ^a	マトリックス 効果	回収率 真度 (%) ^a	並行精度 RSD (%) ^a	マトリックス 効果
ヒ素	99.7	3.5	1.14	102.7	3.1	1.20	102.2	3.1	1.21
鉛	98.2	2.7	1.13	93.6	10.2	1.10	94.2	3.4	1.12
6価クロム	101.7	5.9	1.13	98.8	6.1	1.10	94.9	8.2	1.13

a: n = 4.

表 17. ヒ素、鉛、6 価クロムの ICP-MS 分析法の検討における
人体試料中ヒ素、鉛、6 価クロムの補正回収率

化合物	補正回収率		
	水	血液	尿
ヒ素	87.5	85.6	84.5
鉛	86.9	85.1	84.1
6価クロム	90.0	89.8	84.0

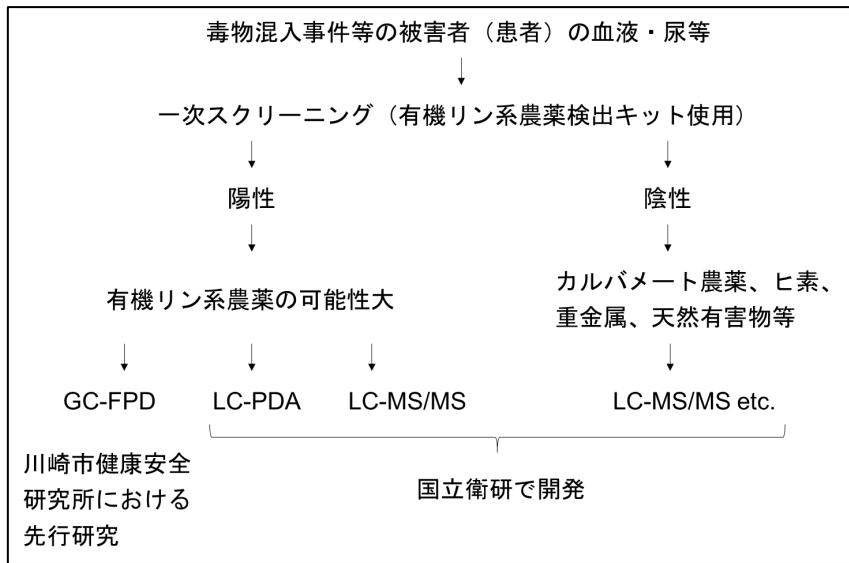


図 1. 本研究成果として作成する人体試料分析フロー（案）

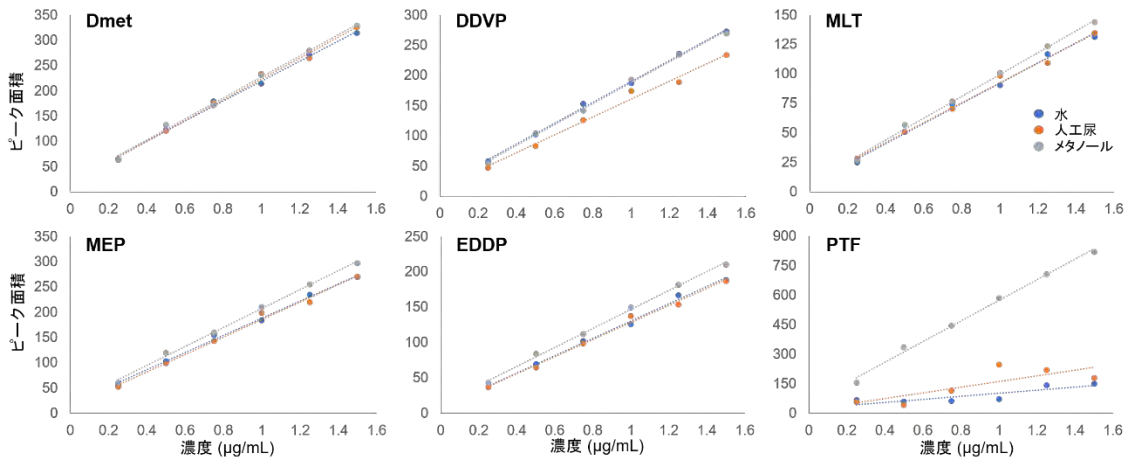


図 2. 有機リン系農薬 6 種の HPLC 分析法の検討における水、人工尿、メタノールを用いて作成した農薬 6 種の検量線

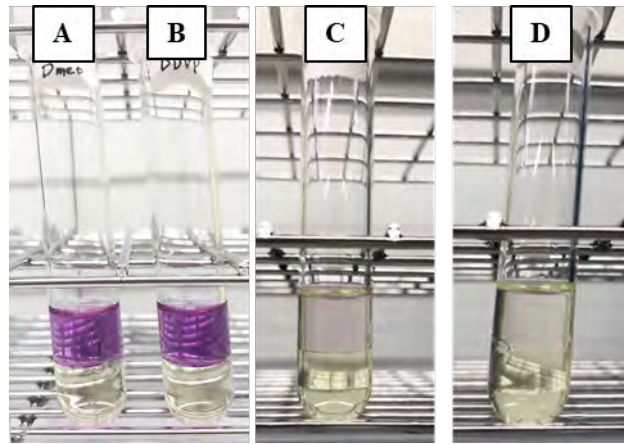


図 3. 有機リン系農薬検出キットによる人工尿試料の分析.

A: dimethoate (検出感度 1 ppm)、B: dichlorvos (検出感度 1 ppm)、C: acephate (検出感度 10 ppm)、
D: methamidophos (検出感度 1 ppm)。人工尿中農薬濃度は全て 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ \div 10 ppm.

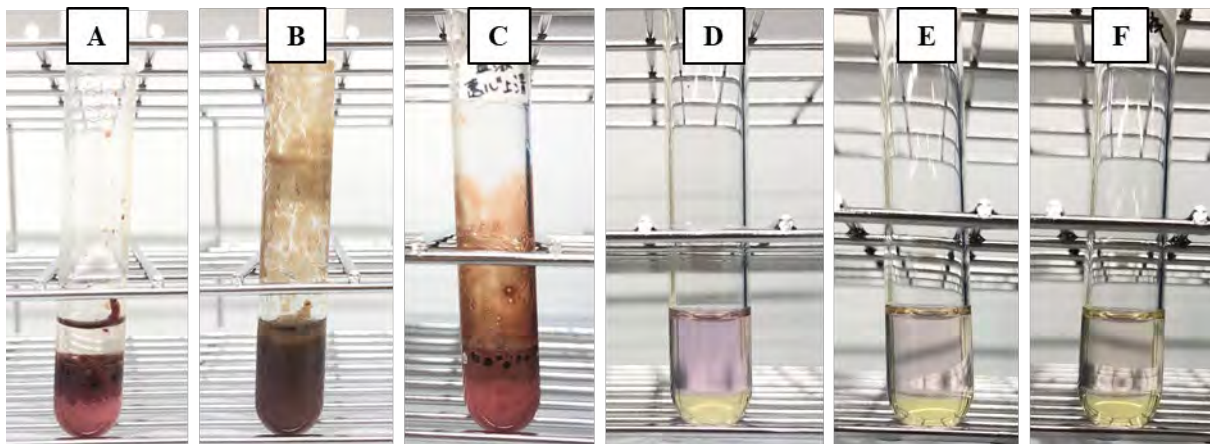


図 4. 有機リン系農薬検出キットによる血液試料の分析検討.

A: 未処理試料、B: 2 倍量の水添加で希釈した試料、C: 遠心分離後の上清試料、D~E: 2 倍量のメタノール添加し遠心分離後の上清試料。A~D: dichlorvos、E: dimethoate、F: acephate.

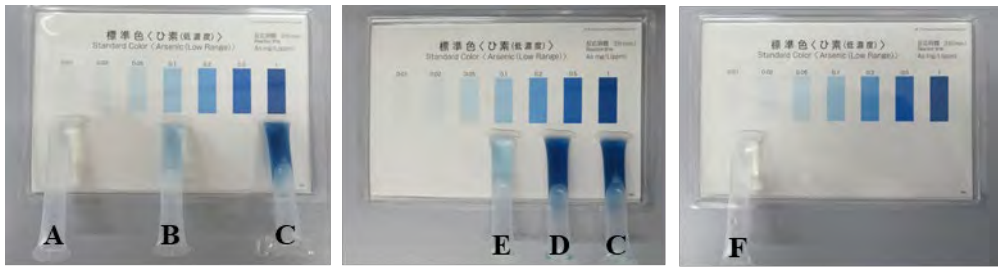


図 5. ヒ素の測定結果。

A : ヒ素標準溶液 (0.01 ppm)、B : ヒ素標準溶液 (0.1 ppm)、C : ヒ素標準溶液 (1 ppm)、
 D : 人工尿_ヒ素添加試料 (1 ppm)、E : 人工尿_ヒ素 blank 試料、
 F : ヒ素標準溶液 (1 ppm、2 倍量メタノール添加後 (0.3 ppm))。

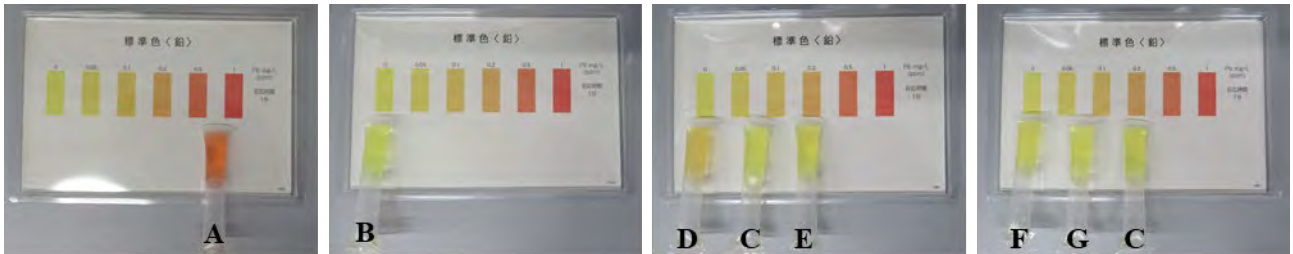


図 6. 鉛の測定結果。

A : 塩化鉛標準溶液 (1 ppm)、B : 人工尿 Blank 試料、
 C : 前処理後超純水 Blank、D : 前処理後人工尿_塩化鉛添加試料 (1 ppm)、
 E : 前処理後人工尿 Blank 試料、F : 前処理後血液_塩化鉛添加試料 (1 ppm)、
 G : 血液 Blank 試料

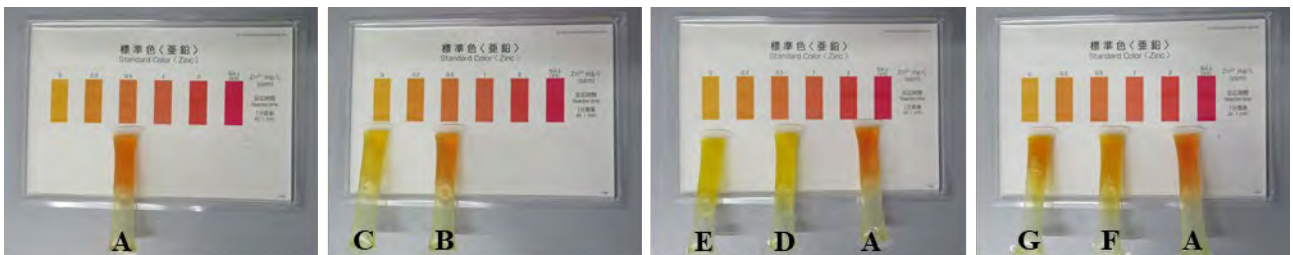


図 7. 亜鉛の測定結果。

A : 塩化亜鉛標準溶液 (1 ppm)、B : 人工尿_塩化亜鉛添加試料 (1 ppm)、
 C : 人工尿 Blank 試料、D : 前処理後人工尿_塩化亜鉛添加試料 (1 ppm)、
 E : 前処理後人工尿 Blank 試料、F : 前処理後血液_塩化亜鉛添加試料 (1 ppm)。
 G : 1 ppm 血液 Blank 試料。

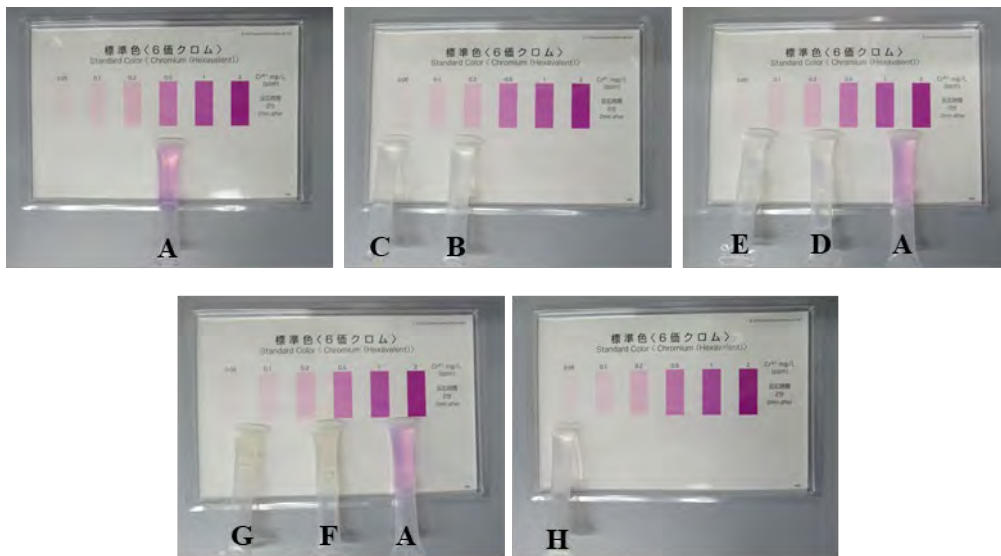


図 8. 六価クロムの測定結果。

- A : クロム酸カリウム標準溶液 (1 ppm)、B : 人工尿_クロム酸カリウム添加試料 (1 ppm)、
 C : 人工尿 Blank 試料、D : 前処理後人工尿_クロム酸カリウム添加試料 (1 ppm)、
 E : 前処理後人工尿 Blank 試料、F : 前処理後血液_クロム酸カリウム添加試料 (1 ppm)。
 G : 前処理後血液 Blank 試料、H : 3 倍希釈後人工尿_クロム酸カリウム添加試料 (1 ppm)。

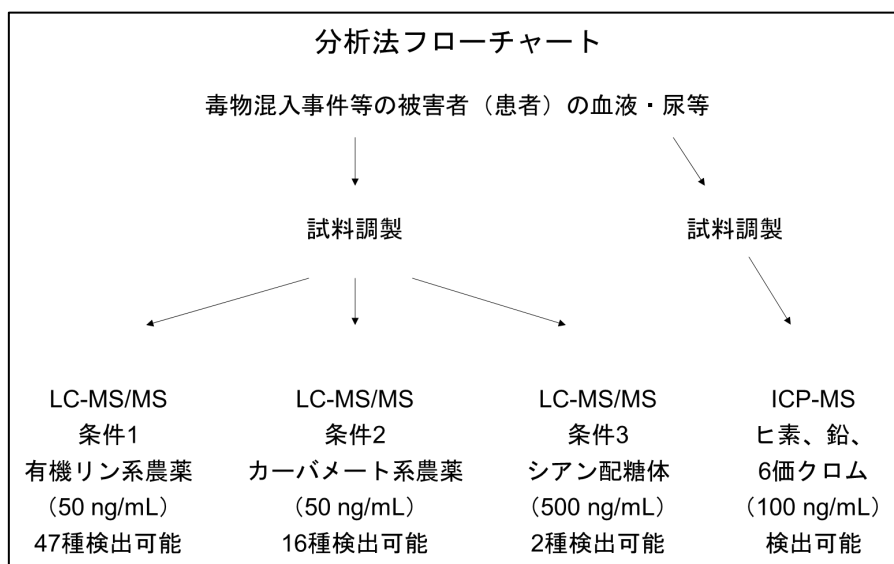


図 9. 本分担研究で構築した分析法フローチャート