

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)
「新型コロナウイルス感染症対策に取り組む食品事業者における食品防御の推進のための研究」
分担研究報告書(令和5年度)

血液・尿等人体試料中毒物及び食品中の毒物・異物の検査手法の開発と標準化

研究分担者 田口貴章(国立医薬品食品衛生研究所)

協力研究者 穂山 浩(星薬科大学薬学部)

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、保健所等自治体において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り、血液・尿等人体試料中の毒物の検査方法の開発及び標準化が必要である。本年度は、食品からのシアン化合物塩(ナトリウムあるいはカリウム)暴露時のために、蛍光検出ポストカラム HPLC 法を用いた尿中のシアン化物イオン及びその代謝産物であるチオシアン酸イオンの迅速同時分析法を開発した。また、新型コロナウイルス感染症の流行により、配達代行により調理済み食品の販路が多様化した中で、調理者・宅配業者に悪意がある可能性に備え、インスタントラーメンから陰イオン界面活性剤をアセトニトリル・水(4:1)混液で抽出し、HLB ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量する分析法を検討した。

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血液・尿等人体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の開発、並びに標準化はまだ十分ではない。

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、通常の実務業務を中断して人体試料分析を開始する必要があると想定されるが、農薬、重金属等、使用された毒物によって適切な分析法を開発することが必要である。我々はこれまでに、LC-MS/MS による人体試料中の有機リン系農薬(47 種類)及びカーバメート系農薬(17 種類)の分析法を開発した他、LC-MS/MS によるシアン配糖体の分析法及び誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-

MS)を用いたヒ素等重金属の分析法について検討してきた。本分担研究課題においては、入手が容易な高極性農薬、顔料に含まれるカドミウム等重金属及びシアン化合物について簡易分析法の開発と標準化を目的とした。

又、新型コロナウイルス感染症の流行により、ゴーストレストラン等の調理のみ行う店舗が増加し配達代行により販路が多様化した中で、調理者・宅配業者に悪意がある場合、調理または宅配中の意図的な毒物・異物混入は比較的容易であると想定される。このことから、調理済み食品中の毒物・異物の既存の分析法の調査・体系化と、より簡易な分析法の新規開発と標準化を併せて進める。

B. 研究方法

R5 年度は、前年度に検討したヒト血液中のシアン化物イオン及びその代謝産物であるチ

オシアン酸イオンの迅速同時分析法から、ヒト尿中の両イオンの迅速同時分析法を検討した。また、食品への毒物・異物混入事例の調査結果に基づき、加工食品中の界面活性剤の分析法を検討した。

(1) 人体試料中シアン化物イオン及びチオシアン酸イオンの迅速同時分析法

・分析試料

ヒト尿は Lee Biosolutions 社が販売するもの（個体別、品番 991-03-S、50 mL。適切な手続きを得て匿名化された試料で、研究倫理審査委員会の手承認済み。）を購入し、実験に用いた。

・前処理法

尿 100 μ L に精製水 900 μ L を添加しよく混合した。遠心分離（8,000 $\times$ g, 25 $^{\circ}$ C, 10 分間）して得た上澄み液を、孔径 0.45 μ L フィルター（ADVANTEC 製）に負荷し、流出液 10 μ L を次項の条件の HPLC に注入した。

なお、添加回収試験を実施した際は、尿 100 μ L にシアン化物イオン溶液（2 ppm または 20 ppm）50 μ L、チオシアン酸イオン溶液（2 ppm または 20 ppm）50 μ L、及び精製水 800 μ L を添加しよく混合した後、同様に遠心分離、ろ過した。

・HPLC 条件（ポストカラム法）

カラム：Scherzo SS-C18 (3 μ m),

4.6 i.d. x 250 mm (Imtakt 製)

温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：12.5 mM 過塩素酸ナトリウム含有
0.1M 酢酸緩衝液とメタノール混液

流速：0.5 mL/min

反応液 1：0.1% クロラミン T 水溶液
(流速 0.1 mL/min)

反応液 2：ピリジン-バルビツール酸混液
(流速 0.1 mL/min)

検出：蛍光検出器（583 nm、Em 607 nm）

注入量：10 μ L

(2) 加工食品中の界面活性剤の分析

・分析対象化合物

陰イオン界面活性剤の標準品には、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸（Linear alkyl benzene sulfonate, LAS）の塩であるデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム（C10-LAS）、ウンデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム（C11-LAS）、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム（C12-LAS）、トリデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム（C13-LAS）、及びテトラデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム（C14-LAS）を各 1 mg/mL 含む陰イオン界面活性剤混合標準溶液（富士フイルム和光純薬製）、並びにラウリル硫酸ナトリウム（SDS）を用いた。

非イオン性界面活性剤の標準品には、*n*-オクチル- β -D-グルコピラノシド（OG）、及び *N,N*-ジメチルドデシルアミン=N-オキシド（DMDAO）、並びにポリオキシエチレンアルキルエーテル（POE）の一つであるポリオキシエチレン（20）ステアリルエーテルを用いた。

また、実試料として、成分表示に「界面活性剤(18%、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム)、安定化剤」と記載されている A 社台所洗剤と、「界面活性剤（34%アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、アルキルグリコシド）」と記載されている B 社台所洗剤を用いた。

・分析対象食品

平成 25 年 3 月 26 日付け厚生労働省 医薬食品局 食品安全部基準審査課 事務連絡「加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法について」を参考に、インスタントラーメン（油揚げ麺（具、スープは除く））、乾燥エビ、及びコンビーフの 3 食品を用いて検討した。

・前処理法

インスタントラーメンの揚げ麺及び乾燥え

びは、ミルサーで粉碎して均一化した。コンビーフはフードプロセッサーで細切均一化した。

試料 1.0 g を量り取り、アセトニトリル・水 (4 : 1) 混液 10 mL を加え 5 分間振とうした後、遠心分離 (1,930 ×g, 室温, 5 分間) し、上澄液を採った。残留物にアセトニトリル・水 (4 : 1) 混液 5 mL を加え 5 分間振とうした後、同様に遠心分離し上澄液を採り、先の上澄み液と合わせた。

この溶液を 40℃以下で減圧濃縮し、残留物に水・メタノール (4 : 1) 混液 5 mL、コンビーフの場合は水 5 mL を加えて溶かしたものを、あらかじめ水・メタノール (4 : 1) 混液 5 mL でコンディショニングした Oasis HLB ミニカラム (500 mg/6 cc, Waters 製) に注入し、流出液は捨てた。水・メタノール (4 : 1) 混液 5 mL で g 減圧濃縮に用いた容器を洗い込んだ後、カラムに注入し、流出液は捨てた。さらに水・メタノール (4 : 1) 混液 5 mL を注入して流出液を捨てた後、メタノール 10 mL を注入し、溶出液を全て採り、メタノールで 10 mL に定容した。この溶液から精確に 2.5 mL を分取し、水を加えて 5 mL に定容したものを、孔径 0.45 μL フィルター (コスモスピンフィルターH、ナカライテスク製) で限外ろ過し、得られたろ液を試料溶液として LC-MS/MS 分析に供した。

・ LC-MS/MS 装置条件

LC 条件

装置: : Acquity UPLC H-Class (Waters 製)

カラム : Inertsil C8-4 (5 μm),

2.1 x 150 mm (GL Sciences 製)

温度 : 40 °C

移動相 : A) 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

B) メタノール

グラジエント : 0 min: 50%B, 2 min: 50%B,

10 min: 99%B, 15 min: 99%B,

15.1 min: 50%B, 20 min: 50%B

流速 : 0.3 mL/min

注入量 : 5.0 μL

MS/MS 条件

装置 : Xevo TQ-S cronos (Waters 製)

イオン化 : ESI (+, -)

Acquisition: SRM or SIM モード

Capillary voltage: 0.25 kV

Source temperature: 150 °C

Desolvation temperature: 500 °C

Cone gas flow: 50 L/hr

Desolvation gas flow: 1,000 L/hr

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

マニュアル操作で最適化した。定量イオンは表 2 に示した。

・ 添加回収試験

A 社台所洗剤及び B 社台所洗剤をそれぞれ 20 mg/mL となるように水に溶かして A, B 混合溶液とし、これを食品試料への添加に用いた。マトリックス添加標準溶液 (終濃度 0.1 mg/mL) は、ブランク試料調製過程のミニカラム溶出液に 1.0 mg/mL A, B 混合溶液を加え、水で定容して調製した。

定量は、1.0 mg/mL の A, B 混合溶液 1 mL に 50% メタノール水溶液を加えて希釈し 0.2 mg/mL としたものを回収率 200% 相当の検量線用標準溶液として扱い、これをさらに 50% メタノール水溶液で希釈して 25%, 50%, 100%, 125%, 及び 150% 相当濃度の検量線用標準溶液を調製し、対象化合物のピークの面積値から検量線を作成し絶対検量線法により実施した。

C. 研究結果

(1) 人体試料中シアン化物イオン及びチオシアン酸イオンの迅速同時分析法

シアン化物イオン (CN⁻) 及びチオシアン酸イオン (SCN⁻) をそれぞれ 0.1 ppm 添加した尿試料を、「B 研究方法」の項に記載した方法で前処理して得た試験溶液を蛍光検出ポストカラム HPLC 法で分析したところ、10.5 分に CN⁻、11.9 分に SCN⁻ のピークを検出できた (図 1_A)。一方、尿ブランク試料から CN⁻ のピークは検出されなかったが、

SCN⁻のピークは検出され、面積値と検量線から 0.13 ppm と算出された (図 1_B)。健常者の尿には内在性の SCN⁻が含まれること、添加試料の SCN⁻のピーク面積値はブランク試料のピークより十分大きいことから、開発した分析法に問題は無いと判断した。

続いて、開発した分析法の妥当性を評価するため、添加回収試験を実施した。

シアン化物イオン (CN⁻) 及びチオシアン酸イオン (SCN⁻) をそれぞれ 1 ppm 添加した尿試料を調製し、実施者 1 名が、同一の添加試料を用い 1 日 2 併行、5 日間試験を実施した。得られた結果から、真度 (回収率) (試料数 = 2)、併行精度 (自由度 = 5 x 1 = 5)、室内精度 (自由度 = 5 - 1 = 4) を評価した。

真度 (回収率) は CN⁻が 80%、SCN⁻が 94%であり、併行精度は CN⁻が 2.8%、SCN⁻が 9.0%、室内精度は CN⁻が 0.49%、SCN⁻が 1.22%と算出された (図 2)。妥当性評価ガイドラインの目標は、真度回収率 70 ~ 120%、併行精度 10%未満、室内精度 15%未満であるので、本研究で開発した分析法は、ガイドラインの目標を十分に満たしていることを確認した。

(2) 加工食品中の界面活性剤の分析

試薬メーカーから販売されている界面活性剤の標準品各種を用いて、LC-MS(/MS)の分析法を検討した。まず、MS 条件を検討し、表 1 にまとめたイオンで測定することとした。

続いて LC 条件を検討した。LAS は直鎖アルカンとベンゼンスルホン酸が結合したものであるが、直鎖アルカンへのベンゼンスルホン酸の結合位置によって異性体が存在するため、分析カラムにオクタデシルシリル化シリカゲル (C18) カラムを用いると、分離能が高すぎてピークが割れる。そのため、オクチルシリル化シリカゲル (C8) カラムを用いた。移動相及びグラジエントについて検討し、「B 研究方法」の項に記載の条件で分析したところ、LAS はどの鎖長のものも 1 本のピークとして検出され、

他の界面活性剤も確認できた (図 4)。

A 社及び B 社の界面活性剤を水に溶かし、検討した LC-MS/MS 条件で確認したところ、表示に記載の界面活性剤が確認できたことに加え、MS スペクトルから、標準品が販売されていない界面活性剤と思われるピークも検出された。実試料に近いものでの評価を考慮し、A 社及び B 社の洗剤を等量ずつ混合し適宜希釈した A, B 混合溶液を用い、標準品が販売されている界面活性剤を分析対象化合物とした。ただし、B 社混合溶液に含まれる POE は保持時間、MS スペクトルがポリオキシエチレン (20) ステアリルエーテル標準品と一致しないものが 4 種検出されたが、このうち MS スペクトルからポリオキシエチレン (9) ウンデシルエーテル (POE (C11))、またはポリオキシエチレン (9) トリデシルエーテル (POE (C13)) と推定されたピークを検討対象とした (図 5)。

インスタントラーメンを用いて抽出溶媒の種類と液量等について検討した。A, B 混合溶液を添加した試料と無添加の試料から同様に抽出し、無添加の試料から調製したマトリックス標準溶液に対する回収率を評価した。抽出溶媒の組成等を比較検討した結果、アセトニトリル・水 (4 : 1) 混液 10 mL 及び 5 mL で 1 回ずつ抽出し、遠心分離で不溶物を除去する方法を採用した。精製は、既報を参考にジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (Oasis HLB, Waters 製) で精製する方法を検討し最適化を図った。

検討した分析法の妥当性を評価するため、実施者 1 名が、同一の添加試料を用いて 1 回 5 併行、1 日の添加回収試験を実施した。「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」を参考に、目標は真度 (回収率) 70~120%、併行精度 10 RSD%未満とした。陰イオン界面活性剤のうち C10 ~ C12-LAS は、インスタントラーメン及びコンビーフで良好な真度・精度であったが、乾燥えびからは十分に回収されなかった。アルキル鎖長が伸びた

C13-LAS 及び C14-LAS は、いずれの加工食品からも回収率が低下した。SDS は、コンビーフからの回収のみ良好であった。非イオン性界面活性剤は、OG のインスタントラーメンからの回収と POE (C11)のコンビーフからの回収は目標値を満たしたが、それ以外は本法による回収不良、あるいは回収不能であることが判明した。

D. 考察

(1) 人体試料中シアン化物イオン及びチオシアン酸イオンの迅速同時分析法

人体試料中シアン化物イオン及びチオシアン酸イオンの迅速同時分析法として、昨年度開発した血液試料の分析法に続き、今年度は尿試料の分析法を開発した。本研究で用いた尿試料からチオシアン酸イオンが検出されたが、正常な血漿中には濃度 0~14 µg/100g 程度のシアン化物が存在し、それらはチオシアン酸塩に代謝され尿中に排泄されることが知られている（平成 22 年 10 月 19 日、府食第 815 号、清涼飲料水評価書 シアン）（図 3）。

開発した尿中シアン化物イオン (CN⁻) 及びチオシアン酸イオン (SCN⁻) の迅速同時分析法は、妥当性評価試験においてガイドラインの目標を満たしたことから、食品テロ等、意図的毒物混入事件発生時に有用であるだけでなく、シアン暴露におけるチオシアン酸イオン代謝量の関係性の解明にも有用であると期待される。

(2) 加工食品中の界面活性剤の分析

陰イオン界面活性剤は、石けんをはじめ古くから多くの種類が開発され、合成洗剤やシャンプーなど、その使用量は全界面活性剤の約 1/3 を占めている。特に直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩 (LAS) は洗浄力、浸透性に優れ、適度な泡安定性を有し価格も低いことから、家庭用合成洗剤の主力として大量に使われる。そのため、水生生物の保全に係る環境基準にて基準値が設定されている。また、非イオン性界面活性剤は、水に溶けてもイオン化しないため水の硬度や電解質の影

響を受けにくく、他の界面活性剤と併用できるうえ、浸透性や洗浄力も十分であり、近年、陰イオン界面活性剤と並ぶ量が使用されている。

陰イオン界面活性剤を主成分とする A 社台所洗剤と、非イオン性界面活性剤を主成分とする B 社台所洗剤を、インスタントラーメンから抽出・精製して定量する分析法を検討したところ、C10~C12-LAS 及び OG の回収率は良好で妥当性評価の目標値を満たしたが、アルキル鎖長の長い LAS や SDS、OG 以外の非イオン性界面活性剤への適用は難しいと考えられる。POE 以外、M. std./S. std. の値が 1.00 に近いことから、十分に抽出できていないと考察した。また、本法は、コンビーフ中に混入する陰イオン界面活性剤の定量には適用可能だが、コンビーフ中の非イオン性界面活性剤の分析、並びに乾燥えびに混入する界面活性剤の分析には、抽出溶媒や精製方法の改良検討が必要と考察した。

E. 結論

尿中シアン化物イオン (CN⁻) 及びチオシアン酸イオン (SCN⁻) の迅速同時分析法を開発した。前年度に開発した血液中の CN⁻及び SCN⁻の迅速同時分析法と合わせ、食品テロ等、意図的毒物混入事件発生時に有用である。

また、調理済み食品のモデルの一例としてインスタントラーメンを試料とし、界面活性剤の分析法を検討した。本法は、コンビーフに混入する陰イオン界面活性剤の一部の分析にも適用可能と考えられたが、他の加工食品や非イオン性界面活性剤の分析には、改良検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Akiyama H, Ishibashi A, Kai T, Kikuchi A, Taguchi T, Fukiwake T, Tsutsumi T, Asakura H, Ito R. Determination of Cyanide and Cyanoglycosides in

Sweetened Bean Paste by HPLC with Fluorescence Detection. *Biol. Pharm. Bull.* 2023; 46, 1024–1026.

2. 古澤魁世, 菊島優奈, 葛西伶乃凜, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 穂山浩, 蛍光検出 HPLC を用いた杏仁を含む食品中のシアン化物イオン及びシアノ配糖体の定量, *分析化学*, 2024, *in press*.
3. Ito R, Kikuchi A, Ishibashi A, Kai T, Terashima A, Iwasaki Y, Taguchi T, Fukiwake T, Tsutsumi T, Imamura T, Akiyama H, Monitoring of cyanogenic compounds behavior during the manufacturing process of sweetened bean paste. *Heliyon* (in submission).

2. 学会発表

1. 古澤魁世、菊島優奈、甲斐剛志、伊藤里恵、田口貴章、堤智昭、穂山浩. 食品テロ対策のためのヒト血液中のシアン化物イオン及びチオシアン酸イオンの同時分析法の確立. 日本食品化学学会第 29 回総会・学術大会（富山）2023 年 6 月 8 日.
2. 菊島優奈、古澤魁世、伊藤里恵、穂山浩. いわゆる健康食品中のシアン化合物の分析法の分析. 日本食品化学学会第 29 回総会・学術大

会（富山）2023 年 6 月 8 日.

3. 田口貴章、難波樹音、穂山浩、堤智昭. 食品テロ対策のための血液・尿等人体試料中のヒ素等重金属の分析法検討（第 2 報）. 日本食品衛生学会第 119 回学術講演会（東京）2023 年 10 月 12 日.
4. 葛西伶乃凜、古澤魁世、菊島優奈、甲斐剛志、伊藤理恵、岩崎雄介、田口貴章、堤智昭、今村知明、穂山浩. 蛍光検出ポストカラム HPLC 法を用いたヒト血液及び尿試料におけるシアン化物イオン及びチオシアン酸イオンの分析法の確立. 日本薬学会 第 144 年会（横浜）2024 年 3 月 30 日

H. 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. 界面活性剤標準品の定量イオン

化合物	イオン化	モード*	定量	定性	保持時間 (分)
C10-LAS	ESI (-)	SRM	297.2 > 183.2	297.2 > 119.2	8.7
C11-LAS			311.3 > 183.2	311.3 > 119.2	9.1
C12-LAS			325.3 > 183.2	325.3 > 119.2	9.4
C13-LAS			339.3 > 183.2	339.3 > 119.2	9.8
C14-LAS			353.3 > 183.2	353.3 > 119.2	10.1
SDS			265.2 > 97.0	265.2 > 119.2	8.4
OG	ESI (+)	SIM	310.4 > 163.1	310.4 > 119.2	6.1
DMDAO			230.3 > 58.1	230.3 > 119.2	9.3
POE (C11)			587	-	10.0
POE (C13)			615	-	10.6

*: SRM : 選択反応モニタリング、SIM : 選択イオンモニタリング.

表 2. 添加回収試験における回収率

化合物	インスタントラーメン			乾燥えび			コンビーフ		
	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	M. std./ S. std.	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	M. std./ S. std.	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	M. std./ S. std.
C10-LAS	88.2	4.0	0.98	23.5	71.5	1.05	94.4	1.7	0.99
C11-LAS	82.2	4.5	1.01	28.1	69.8	0.85	100.1	3.0	1.00
C12-LAS	80.6	7.2	1.00	52.7	42.0	0.98	93.8	3.8	1.02
C13-LAS	56.4	8.5	0.97	47.9	14.7	0.68	71.8	2.9	0.87
C14-LAS	35.7	22.6	1.00	38.3	17.1	0.23	62.9	17.0	0.62
SDS	64.3	2.2	1.01	28.6	72.6	1.27	102.4	1.4	1.02
OG	85.7	7.8	0.91	11.3	23.1	1.09	73.0	42.7	1.01
DMDAO	12.4	50.1	0.98	-	-	0.92	48.6	6.3	0.92
POE (C11)	2.7	70.4	0.98	64.8	14.5	0.74	93.6	2.0	0.96
POE (C13)	-	-	0.56	-	-	0.66	-	-	1.01

*1: M. std./S. std.は溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積比.

*2: グレーの欄は目標を満たさなかったもの.

*3: 欄の-表記は算出不能の意.

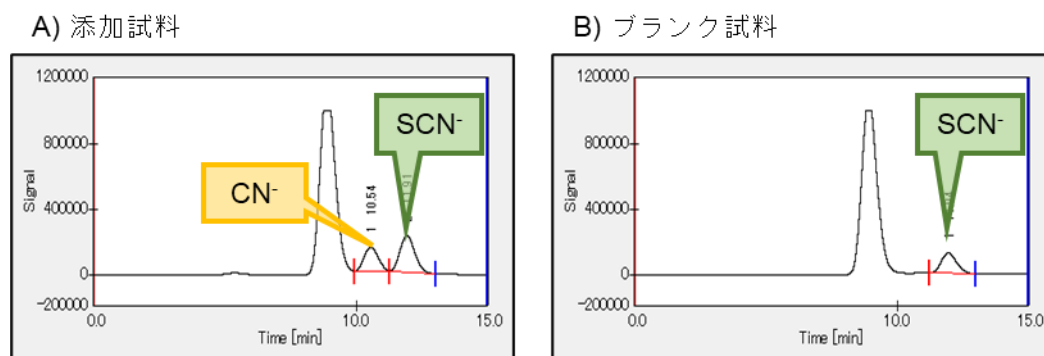


図 1. 尿試料のクロマトグラム. A) シアン化物イオン (CN^-) 及びチオシアン酸イオン (SCN^-) を添加した試料 (添加濃度 0.1 ppm)、B) 尿ブランク試料.

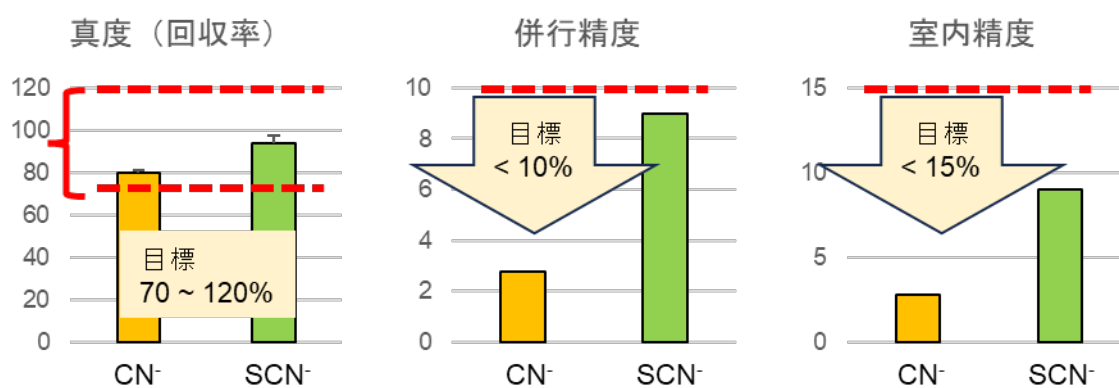


図 2. 尿中シアン化物イオン (CN^-) 及びチオシアン酸イオン (SCN^-) 分析法の妥当性評価試験結果

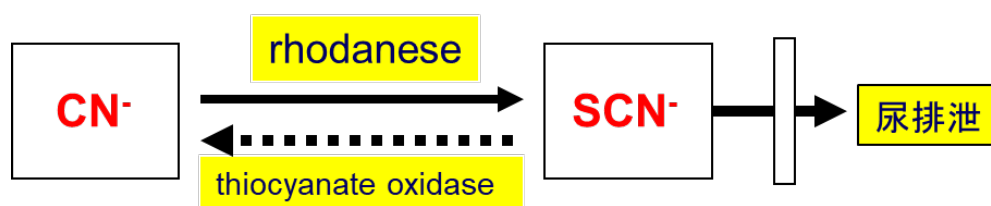


図 3. 生体内シアンイオン代謝経路.

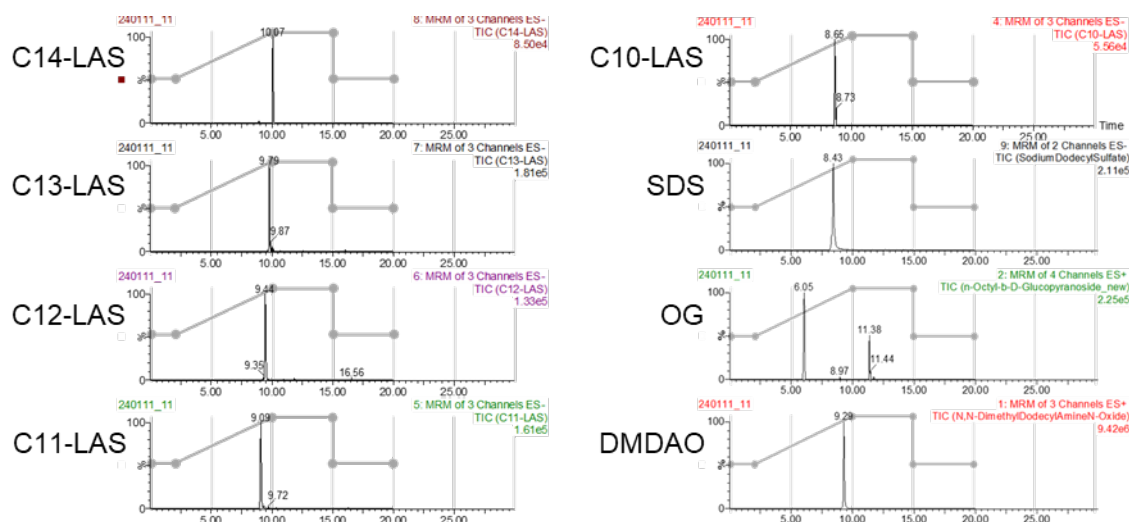


図 4. 界面活性剤の標準品の SRM モードでのクロマトグラム例とグラジエント条件.

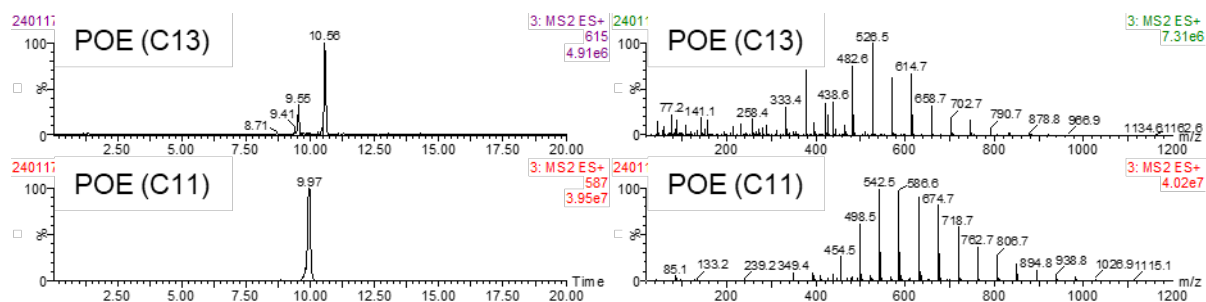


図 5. B 社台所洗剤に含まれる POE のうち 2 種のクロマトグラム (左) と MS スペクトル (右) . 本分析条件では、POE は $[M + NH_4]^+$ として検出される。また、保持時間はアルキル鎖長に相関し、オキシエチレンの重合度の異なる分子は同じ保持時間に検出される。