

LC-MS/MS を定量手段とした食品中の残留化学物質等の
分析法開発および公定法への適用に関する研究

Development of analytical methods and their application to
official methods for the determination of chemical residues in
foods by LC-MS/MS

朝倉 敬行

目次

序論	1
本論	
第 1 章 畜産物中の抗ウイルス剤の分析法に関する研究.....	15
緒言	
実験方法	
結果および考察	
小括	
第 2 章 食品中の農薬・動物用医薬品の分析法に関する研究.....	44
第 1 節 LC-MS/MS による農産物および畜水産物中のジニコナゾールの分析法.....	44
緒言	
実験方法	
結果および考察	
小括	
第 2 節 LC-MS/MS による畜産物中のジルパテロールの分析法	62
緒言	
実験方法	
結果および考察	
小括	
第 3 章 食品中の有害物質の分析法に関する研究.....	79
第 1 節 LC-MS/MS による魚粉中のヒスタミンの分析法	79
緒言	
実験方法	
結果および考察	
小括	

第2節 LC-MS/MS を用いた生鮮トマトおよびトマト加工品中のトマチンの 分析法.....	91
緒言	
実験方法	
結果および考察	
小括	
結語	110
謝辞	115
参考文献	116
主論文	129

序論

古くから「衣・食・住」は人間が社会生活を営む上での重要な三要素とされている。これらに関する課題は国が国民に対して責任を負わなければならない公衆衛生上の大きな問題とされ、国による種々の施策が講じられている¹⁾。特に「食」は人の生命と健康を維持するものとして最も重要な問題であり、食品衛生上の課題の解決は行政に対する国民ニーズの最も高いものの一つとされる。食品を安全な状態に保ち、飲食によって起こる危害を防止することを食品衛生というが、WHO は食品衛生を「生育、生産、製造から最終的に人に摂取されるまでのすべての段階において、食品の安全性、健全性、および正常性を確保するために必要なあらゆる手段を意味する」と定義している²⁾。これらが検証、評価されて「食の安全と安心」が担保されるといえる。

現在の我が国の食は「飽食の時代」といわれて久しいが、これは食品の製造技術や加工方法の発達だけでなく、経済成長に伴う食品輸送網の発達や冷凍・冷蔵の技術が進んだことにより、様々な国々から今まで目にしたことのないような生鮮食品や加工食品が手軽に入手できるようになったことと無縁ではない。このように食の国際化、多様化が進む一方、我が国における食糧自給率は37%（カロリーベース、2021年農林水産省食糧需給表）³⁾にまで低下し、先進国の中では最も低く、その多くを海外からの輸入に頼っているのが現状である。そのため、輸出国の衛生状況、農薬や動物用医薬品の使用状況など我が国に輸入される食品の安全性をどのように検証していくのが大きな問題となっていることは言を俟たない。

一方、世界の人口は増え続け、「世界人口白書 2022」⁴⁾によれば、2022年の世界人口は79億5000万人とされるが、100億人になる日もそう遠い話ではない。人口の増加によって、経済格差、資源の枯渇、環境問題が大きく取り上げられるようになったが、そのすべてに「食」が関わっていると言える。人口問題の解決のためには、食糧の増産を行わなければならないが、返って耕作地開拓のための森林伐採や地下水の大量消費さらに広範な農薬の使用による土壌微生物の減少などにより環境の荒廃が進み、これらは近年増加傾向にある異常気象の原因とも考えられている。こうしたことは国や地域によって耕作地面積の縮小や収穫量の減少を来し、食糧不足や貧困などの経済的な格差が広がる要因ともなっている。将来の食糧不足を懸念し、遺伝子組み換え食品⁵⁾、ゲノム編集食品⁶⁾、代替肉⁷⁾、培養肉⁸⁾、昆虫食⁹⁾など新しい食品¹⁰⁾が実用化され、また、効率よく大量生産する方法の開発研究も行われている。一方、「飽食」の裏側では消費されず処分される食品も大量にあり、

年間 646 万トン（平成 27 年消費者庁データ）にも及ぶ食品が廃棄されており¹¹⁾、対策として廃棄される食品の保存や包装形態を変えることで賞味期限の延長、フードバンクへの提供、飼料への転用など、食品廃棄物を資源として社会に循環させる（フードループ）取り組みも進められている¹²⁾。しかし、賞味期限の延長やフードバンクへの提供を行うにしても、これらの食品が安全、安心であることを証明しなければ消費者に受け入れられない。また、2000 年代においても多くの食品偽装問題¹³⁾や輸入食品での農薬や動物用医薬品の残留問題の他、有害物質による食品汚染など食品の安全、安心を脅かす出来事が連日マスコミで取り上げられるほど、大きな問題となった。こうしたことを受け、法律の改正や新たな法律の制定が行われてはいるが、「安心、安全」を担保するには科学的な根拠をもって検証することが重要である。その実践として、著者が勤務する食品衛生法で定められ厚生労働大臣の認可を受けた登録検査機関をはじめ、国の機関である検疫所、地方自治体の衛生研究所や保健所等においては、多くの生鮮食品（農産物、畜水産物）やそれらを用いた加工品中の農薬、動物用医薬品（以下、農薬等）あるいは一般食品中の食中毒菌などの有害微生物、カビ毒などの有害物質、着色料や保存料などの食品添加物また、器具・容器包装等について検査が行われている。

我が国をはじめ、多くの国で最も関心の高い食品衛生の問題の一つは農産物中の農薬や畜産物中の動物用医薬品の残留問題であろう。わが国で残留基準が設定されている農薬等は現在 760 品目あるが、日々新しい農薬等が合成され、製造されているため、残留基準が設定されていない農薬等が使用されている恐れもある。そこで、諸外国から輸入される農産物や畜産物、それらを加工した食品をはじめ、できるだけ多くの食品に適用できる分析法の開発は食品衛生学上、大変有意義であると考ええる。

本研究では、海外での使用実績がある抗ウイルス剤、動物用医薬品および日本では登録がされていない農薬等について、食品中からの分析法の開発を行った。また、食品中の有害物質についても操作が煩雑で長時間を要する分析法を改良して簡便な分析法の開発を行った。さらに、分析法の開発にあたっては、食品分析で汎用的に使用され、高感度分析が可能な液体クロマトグラフータンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いて、精度よくまた頑健性のある分析法とすることに主眼におき研究を行った。

ここでは、まずはじめに食品関連法規、次に分析法の開発、そして機器分析について概説する。

1. 食品衛生法と食品に関係する法規

日本国憲法第 25 条に「すべての国民は、健康で文化的な最低限度の生活

を営む権利を有する。」（生存権）とあり、国には、公衆衛生の向上、増進を推進する施策の遂行が求められている。食品衛生行政の根幹である「食品衛生法」は、『飲食に起因する衛生上の危害の発生を防止し、公衆衛生の向上及び増進に寄与すること』を目的に 1947 年（昭和 22 年）に制定された。戦後の復興が進む中、1950 年～1960 年代は、食品衛生の概念がまだ十分に浸透しておらず、製造に粗悪な原料を使用したことによる森永ヒ素ミルク事件¹⁴⁾、工場の設備の欠陥を原因とするポリ塩化ビフェニル（PCB）およびポリ塩化ジベンゾフラン（PCDF）によるカネミ油症事件¹⁴⁾、工場廃液中の有機水銀により汚染された魚介類の喫食が原因の水俣病¹⁵⁾など有害な物質による中毒事例が相次いだ。これらの事件や事故では多くの死亡者の発生や患者に後遺症が残るなど、食品公害として社会的に大きな問題となった。このような出来事を受け、1968 年（昭和 43 年）に消費者保護基本法が制定された。また、1972 年（昭和 47 年）には食品衛生法が一部改正され、事故が発生してから対応策を検討する方式から、あらかじめ危害の発生を予測し、その予防に重点が置かれることとなった。それにも関わらず、その後も微生物（腸管出血性大腸菌 O157 など）に起因する食中毒、動物（貝、フグなど）や植物（きのこ、じゃがいもなど）が有する自然毒による食中毒などの事故や事件はその大小に関わらず毎年発生している¹⁶⁾。

Table 1. Food Accidents and Food Mislabeling in the 2000s

発生年度	食品	概要
2000	低脂肪乳	低脂肪乳に使用した脱脂粉乳が黄色ブドウ球菌に汚染
2002	輸入牛肉	BSE発症対策の国産牛肉買い取り制度の悪用
2002	肉まん	肉まんに許可外添加物（TBHQ）の使用
2007	牛肉	牛肉に豚肉、食パン、血液などの異物で水増し、色味等の調整後、牛肉100%として販売
2007	アイスクリーム	一度表示した賞味期限の延長、大腸菌群検出のアイスクリームの販売
2007	和菓子	返品、在庫商品を冷凍後、再出荷（賞味期限の延長）
2008	冷凍食品	中国産冷凍餃子に高濃度の農薬を検出（意図的な混入）
2008	輸入うなぎ	外国産うなぎを国産うなぎと偽装して販売
2008	事故米	農薬、カビが検出された事故米を食用として転売

2000 年代には、表 1 に示すように賞味期限の改ざんや大量に農薬等が混入した食品が輸入されるなど相次いで事件、事故が起き、食の安全、安心は消費者にとって最も関心のあるテーマとなった。また当時、食品添加物については、いわゆるポジティブリスト方式と呼ばれる規制に基づき、使用して良い添加物について、規格基準と食品ごとの使用基準が設定されていた。一方、

農薬や動物用医薬品（以下農薬等）については、当時、250種の農薬、33種の動物用医薬品に食品ごとの残留基準値が設定されているのみであった。従って、残留基準値が設定されていない農薬等が検出された際に食品衛生法の違反として行政処分の対象とすることができなかった。こうした制度の矛盾の見直しが行われ、2003年（平成15年）の食品衛生法の改正ですべての農薬等を規制の対象として残留基準値が設定され、残留基準がないものや基準値を超えて農薬等が残留する食品の販売等を原則禁止するポジティブリスト制度が導入された。このポジティブリスト制度（2006年5月29日施行）では、約800種の農薬等に食品ごとの残留基準値が設定された。また、新たにリストの加えられた農薬等でこれまで残留基準値が設定されていないものについては、国際基準であるコーデックス基準、アメリカ、カナダ、EU、オーストラリアおよびニュージーランドの基準や環境基準である登録保留基準を参考にして暫定的に基準値が設定された。この暫定基準値については、食品安全委員会が毒性試験などの結果を踏まえて安全性の評価が終了したものは、厚生労働省により残留基準値が設定されるものとした。その考え方の基本は、人が生涯その物質を毎日摂取し続けたとしても、健康に対する有害な影響が現れないと推定される許容一日摂取量（ADI：Acceptable Daily Intake）または24時間又はそれより短時間の間に摂取しても健康への悪影響がないと推定される急性参照量（ARfD：Acute Reference Dose）等の食品健康影響評価（リスク評価）等に基づいて行われる。すなわち、食品安全委員会の答申に基づいて厚生労働省の薬事・食品衛生審議会がADI等の指標を下回るように残留基準値を設定することになっている(図1)。

図2に示した通り、ポジティブリスト施行時には、残留基準値が設定された農薬等は41種、暫定基準値として設定されたものは760種であったが、食品安全委員会の諮問等の手続きが終了し、2020年（令和2年）時点で新規の農薬等を含め491種の農薬等に残留基準値が設定されるに至っている。さらに、日本国内での農薬等の登録がなく諸外国においても基準値が設定されていないものは、人の健康を損なうおそれのない量として厚生労働大臣が定める一定量として0.01 ppmが一律基準として設定され、これ以上検出されたものについては行政処分の対象となることとなった。人の健康に影響することから農薬等の残留基準値の設定には多くの時間がかかるが、今後も未設定のものについては見直しが行われ、残留基準値が新たに設定される農薬等は増えていくものと考えられる。また、食品衛生法は、時代背景に合わせて適時、改正され2017年（平成30年）にはHACCP導入の義務化、食品用器具・容器包装のポジティブリスト制度化などの最新の改正が行われている。

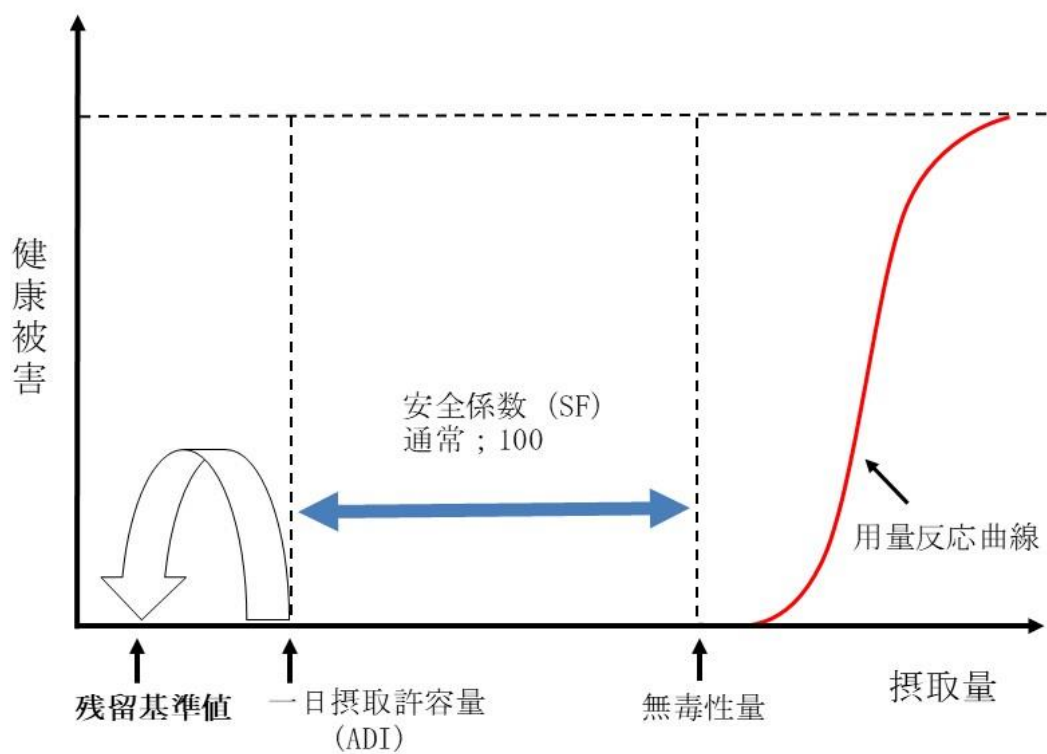


Fig.1. Determination of the ADI value based on toxicity evaluation

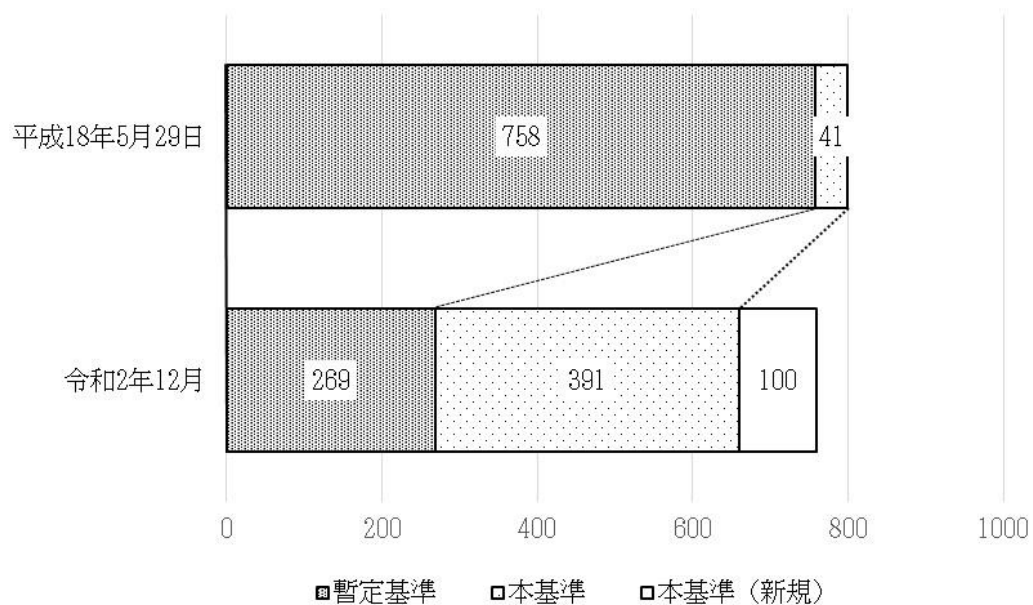


Fig.2. Status of revision of residue standards for pesticides and other chemicals after the Positive List went into effect

食品を取り巻く法規は、食品衛生法以外にも食品、農林水産品についての品質の基準と品質に関する規格を定めた「JAS法（日本農林規格等に関する法律）」、食品の表示について定めた法律「食品表示法」、食品の安全性確保に関わる「食品安全基本法」のほか、「健康増進法」、「水道法」、「水質汚濁防止法」、「環境基本法」、「PL法」など様々な省庁が管轄する法律が食品に関わっている。

2. 残留化学物質の分析法について

食品関連の法律がいくつあっても食品の安全、安心には繋がらない、その法律が守られているかどうか検証する手法、すなわち食品を分析してその分析結果を評価する手段がなければならない。その分析法は測定結果のばらつきが少なく、どこの試験所で誰が実施しても同じ結果が得られることが求められることは言うまでもない。しかしながら、農薬等については、実際には多種多様の食品中に含有される農薬等について分析法が完備されているわけではなく、早急な整備が望まれている。また、科学の進歩に合わせて、多くの農薬等を一斉に分析できる方法や微量に含有された農薬等の分析、測定に影響を与える食品成分との効率的な分離方法の開発とともに分析法の精度の向上も求められており、既存の分析法の改善、改良も併せて求められている。

2-1. 食品中の抗ウイルス剤の分析法

ウイルスは、形態的に細菌やカビなどよりも小さな微生物である。細菌のように分裂を繰り返して増殖するのではなく、まず、ヒトや動物などの宿主に感染し、ウイルスの表面にあるタンパク質が宿主細胞の表面のレセプターに吸着する。その後、細胞内に入り込み、遺伝子情報の複製とタンパク質合成がそれぞれ行われて増殖し、宿主細胞外に放出され感染症の発症や周囲への感染を促すことになる。牛や豚等の偶蹄類動物に発症する口蹄疫¹⁷⁾や鶏やウズラなどの鳥インフルエンザ¹⁸⁾、¹⁹⁾などは、ウイルスが病原体であり、近年の我が国や諸外国での大流行は記憶に新しい。

ウイルスは、宿主の細胞内に入り込み増殖するため、ウイルスを死滅させる薬剤は、宿主となったヒトや動物等にも影響が出ることが予想されることからウイルスの増殖を抑制する抗ウイルス剤の開発は難しいといわれる²⁰⁾。こうしたことから、ウイルスによる疾病の予防、治療には一般的にワクチンが用いられることが多く、インフルエンザや新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の予防にもワクチン投与が行われている。しかし、化学合成の抗ウイルス剤は容易に適宜使えることから種々のウイルス性の疾病に対して多くの抗ウイルス剤が開発されている。特に畜産や養鶏場では、抗ウイル

ス剤は飼料に混ぜて投薬することができ、その利便性から家畜の疾病予防、治療に用いられることがある。我が国では食用の家畜への未承認薬の使用及び適応外使用は原則認められていないが、諸外国では、予防や治療の目的で家畜などに抗ウイルス剤やワクチン投与が行われることもあり、実際、加工肉に抗ウイルス剤が残留していた事例も発生している。これらの薬剤が残留している食品の摂取は、薬剤耐性やアレルギー発現など健康被害につながることもあり、残留の有無の確認は食品衛生学上、有意義であり、精度の高い分析法の開発が必要であると考え、研究を行った。

2-2. 食品中の農薬および動物用医薬品の分析法

農薬とは、「農作物及び農作物等の生理機能の増進又は抑制に用いられる植物成長調整剤、発芽抑制剤その他の薬剤をいう。」と農薬取締法に定義されている。農薬は、栽培している作物に対する病害虫や雑草などの発生を抑え、一定の収量と品質の維持に用いられるが、実際、農薬を用いないで栽培した場合、収量に大きな影響があることが分かっている。動物用医薬品とは、「人又は動物の疾病の診断、治療又は予防に使用されることが目的とされている物であって、機械器具等でないもの。」と医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性確保に関する法律に定義されている。動物用医薬品は、畜水産物の病気の治療、予防に用いることで品質の維持、安定した供給に貢献している。農薬及び動物用医薬品は、化学的性質（水溶性、脂溶性、酸性物質、塩基性物質など）、物理的性質（沸点、融点など）が異なる多種多様な化学物質であり、食品の安定供給のほか、農業や畜水産業の従事者の肉体的負担軽減にも大きな貢献をしている。一方では農薬の散布時に起こる飛散（ドリフト）による汚染が問題視されている。農薬のドリフトには、スプレードリフトとベーパードリフトとがあり、スプレードリフトは散布時に起こるドリフトであり、ベーパードリフトは農薬散布後に土壌や作物に落ちた農薬の有効成分が蒸気圧等の物理化学的性質に従って、ガス化または粒子状の物質に吸着して拡散する飛散である。どちらの場合も、目的外の作物に付着したり、河川等を通して、意図しない農作物や畜水産物に取り込まれて残留することが危惧される。このため、残留濃度を定量するための分析法は、多くの食品に適用できる分析法であることが必要となる。

海外から輸入される生鮮品や加工品を含む様々な農畜水産物における輸入時の農薬や動物用医薬品の分析は、主要な港、空港に設置されている国の機関である検疫所や横浜および神戸に設置されている輸入食品検疫検査センターでモニタリング検査として実施されている。また、輸入品を含め国内で流通している食品については地方自治体の衛生研究所や保健所が中心となって収去検査を実施している。しかし、年間 31,064,063t、輸入届け出数と

して 2,352,082 件（2020 年、令和 2 年）²¹⁾と膨大な件数の食品が世界各地から輸入されており、すべての食品を検査することは難しいことから、その多くを登録検査機関が検査を行っている。これら検査施設で実施される農薬等の検査は食品衛生法の残留基準値に適合しているか否かを判断する試験である。試験検査に用いる分析法は、法律で定められた告示法（延べ 24 法）、監督官庁から発出された通知法（多くの農薬等を測定するための一斉試験法が液体クロマトグラフ(LC)法が 8 法、ガスクロマトグラフ(GC)法が 2 法、個別の農薬等を測定するための試験法として 337 法）として定められている。試験の結果、残留基準値を上回った食品は、食品衛生法第 11 条（人の健康を損なう量として厚生労働大臣が薬事・食品衛生審議会に意見を聴いて定める量）の残留基準違反として行政処分され、シップバック、焼却処分や用途変更などの措置がとられ国内で流通することはない。図 3 には、輸入届け出数、検査実績、違反率等を示した。ここ数年、違反率は 0.03%前後で推移しているが、輸入の可否を含め食品衛生法違反を判定するにあたっては、輸出国あるいは原産国との摩擦を生じかねないため、その検証に用いた試験法の精度は非常に重要な問題となる。特に輸入食品の中にはわが国で登録されていない農薬や動物用医薬品が使用されている可能性もあり、加工品では製造時に同時に使用されている副材料の影響で分析測定時に妨害となるピークが出現するなど試験検査が困難な場合もある。また、ポジティブリストに記載されているか、否かにかかわらず、すべての農薬等が試験検査の対象となるため、どのような食品からでも分析できることが求められている。食品中の農薬等の試験検査は先に挙げた告示法²²⁾や通知法²³⁾で行うのが原則であるが、これらで農産物や畜水産物中のすべての農薬等の試験検査が網羅されるわけではなく、食品衛生検査指針²⁴⁾、²⁵⁾、衛生試験法・注解²⁶⁾、試験所独自の方法の他、近年 QuEChERS 法²⁷⁾、²⁸⁾と呼ばれる迅速で簡易な一斉分析法が用いられる場合もある。そこで試験を実施するにあたり、これらの試験法を用いて算出された結果が妥当なものであるかを確認する必要がある、その方法についても厚生労働省から通知²⁹⁾、³⁰⁾されている。しかし、膨大な数の農薬等と検査対象食品に比較して分析法の整備は十分ではないため、現在、国立医薬品食品衛生研究所を中心に登録検査機関や地方衛生研究所が共同して試験法の開発に取り組んでいる。試験法は、残留基準値が改正された農薬等の化合物や輸入国からインポートトレランス申請があった農薬等の化合物を対象に作成されている。これらのことから、高感度の分析機器を用いて精度の高い分析法の開発について研究は重要である。

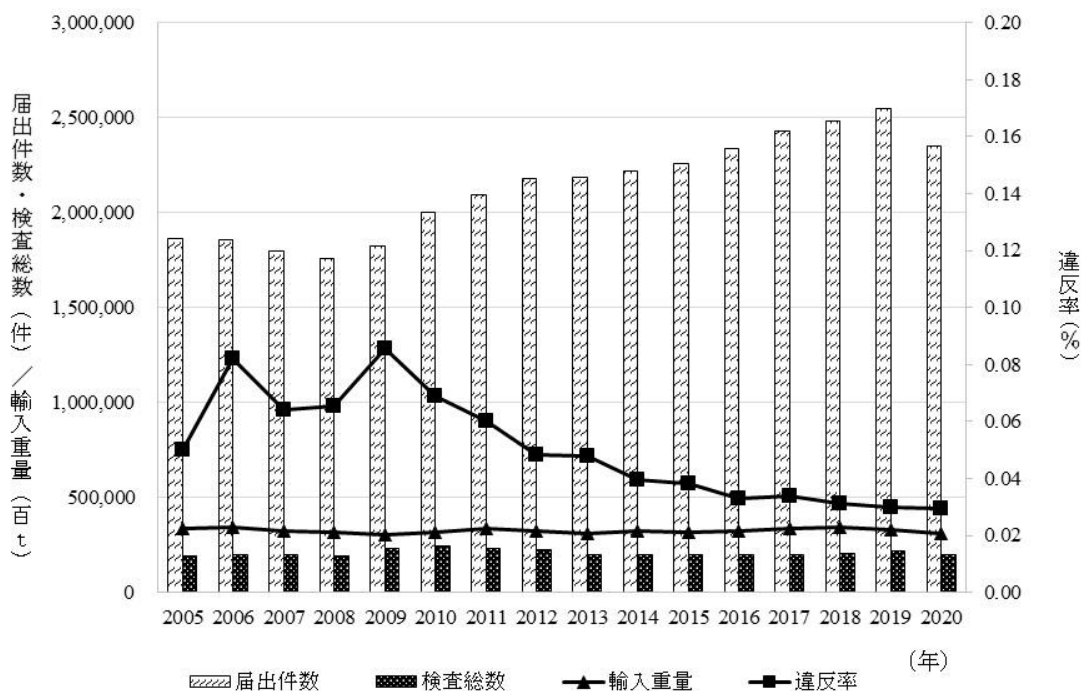


Fig 3. Imported food import weight, number of import notifications, total number of inspections and inspection violation rates

2-3. 有害物質の分析法

有害物質とは、人の健康や生態系に対して何らかの有害な作用をもたらす化学物質のことを言う。我が国の4大公害病であるイタイイタイ病や水俣病は、それぞれカドミウム、メチル水銀が環境中に放出され、水や食品を介してヒトへの健康被害につながった。また、鉛やヒ素のような有害物質の混入や農薬等も過度に使用されると人や家畜の生体に取り込まれ、健康被害を及ぼすことがある。さらに、植物や生物の中で非意図的に作り出されるアルカロイド^{31), 32)}やアフラトキシン³³⁾などの自然毒もある。本項では、化学物質が原因の食中毒としてよく知られているヒスタミンおよびトマト中の苦味成分であるトマチンの分析法について検討した。

ヒスタミンは、タンパク質を構成する20種類のアミノ酸の一つであるヒスチジンが海洋細菌(フォトバクテリウム属菌等)や腸内細菌(モルガン菌、クレブシエラ・オキシトカ菌等)の酵素によって生成される物質であり、サバ、イワシ、マグロなどの赤身の魚にヒスチジンが多く存在することから、これらが中毒原因魚種となることが多い³⁴⁾。

畜産業や魚の養殖業は、肉類、鶏卵や魚介類の安定供給に欠かせない事業になっている。畜産や養殖で飼料の主原料として用いている魚粉は、畜産動

物や養殖魚にとって大切なタンパク源となっており、海外からも輸入されている。配合飼料に用いる魚粉には、スケトウダラ、サンマ、イワシの他、水産製品の副産物なども原料として用いられており、魚粉の品質は、配合飼料としての品質に直結し、畜産動物や養殖魚の発育にも影響する。しかし、飼料の品質管理に明確な指標がなく、揮発性塩基窒素、エタノール含量、ヒスタミンなどが鮮度評価として用いられる。ヒスタミン含量が多い飼料を与えられた養殖魚は発育に悪影響が現れることが知られているため、飼料中のヒスタミンの分析は、飼料の品質管理だけではなく、飼育される畜産動物や養殖魚の健康面の管理にも重要な役割を果たす。飼料中のヒスタミン含量の分析には、飼料安全法（飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律）における公定法の位置づけである飼料分析基準³⁵⁾が使用されている。しかし、飼料分析基準に記載されているヒスタミン分析法は、魚粉を対象にキャピラリー電気泳動法と比色法であり、前者は使用機器の普遍性にやや乏しく、後者は操作が煩雑であるなど問題点がある。こうしたことから、簡便で精度の良い分析法の構築は、安定した品質の畜産物、魚介類の供給など広く食品衛生の観点からもとても重要であると考えられた。

食中毒や異物混入、有害物質の残留などの食品事故は、マスコミなどによって大きく取り上げられ、食品企業の企業姿勢や企業信頼度に大きく影響する。食品に異物が混入している際は、視覚や金属探知機などによって確認、改善できるが、食品企業にとって原料や商品の味に対する苦情は、消費者個々の感受性によるところも大きく、その対応は非常に難しい。特に、味覚の五味中でも苦味は、人が認知できる閾値が非常に低く、苦情になりやすい。トマトのトマチン³¹⁾やジャガイモのソラニン³²⁾は、苦みやえぐみの成分として知られている。これらのステロイドグリコアルカロイド（SGA）は、植物にとっては昆虫などに食べられないようにするための生体防御物質であると言われているが、人がSGAを大量に摂取すると食中毒の原因となることから、植物中のSGA含量をできるだけ低く抑える研究が幅広く行われている。しかし、トマトのトマチンについては、苦いという消費者からの苦情がこれまでに複数寄せられている。トマト中のトマチンは、完熟とともに減少していくことが知られているが、トマトは、生食以外にも様々な形態で利用されており、輸入される加工品もケッチャップ、トマトソース、ジュース、菓子など多岐に渡るため、トマチンについて食品に残留する量を管理することは、食品衛生学上、大変意義があると思われる。しかしながら、生鮮トマト中のトマチン分析法の作成やトマト加工品中の含有量調査はあまり行われていないが、苦情の原因として科学的な根拠を提示する意味からもSGA含有量の調査をするための汎用性、迅速性のある分析法の開発は必要である

と考え、研究を行った。

3. 液体クロマトグラフィー質量分析計の活用について

農薬や動物用医薬品は、一般的に残留基準値や検出限界値が低く設定されており、従来からの HPLC や GC では分析感度が十分ではないため、より高感度の機器を用いて測定することが求められるようになった。そこで、これらの農薬等の分析に対して、揮発性化合物や熱安定性の高い化合物の分析には質量分析計を接続したガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS)、次いで、難揮発性化合物や熱によって分解され易い化合物、極性の高い溶媒に溶解する化合物などは、液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS) が導入されると、これによって測定できる農薬等の種類も増加し、試験法の開発に大きく寄与することとなった。これらの機器は、試料導入のための機器 (HPLC、GC など) とこれを接続するインターフェース、試料をイオン化するイオン源、質量分析部等から構成されている。GC-MS は、GC とのインターフェースの開発が容易であったことから、揮発性物質を対象として食品分野だけではなく、環境分野などでも早くから用いられてきた。一方、LC-MS は、フロント部である HPLC から MS 部に導入する際に溶媒を除去することが必要であったことから、GC-MS に比べ開発は遅れた。しかし、1980 年代に熱したネブライザーガスの中へ液体試料を導入し、溶媒を気散させて目的成分をイオン化させる大気圧イオン化法 (API) が開発されたことにより LC-MS が様々な分野で用いられるようになったが、食品の分野に汎用的に用いられるようになったのは 1990 年代後半からである。

このような分析機器の開発により、植物性の農産物に対する農薬分析の分野で GC-MS や LC-MS が汎用されるようになり、様々な食品を対象に試験が実施された。一方、動物用医薬品の分析は、抗生物質のような極性物質が多く、動物性の畜水産物での分析が主であるため、複雑なマトリックスの影響を強く受けその分析は難しかった。したがって、マトリックスの影響を受けやすい HPLC を用いた分析法よりも GC による分析法³⁶⁾⁻³⁸⁾や微生物を用いるバイオアッセイによる分析法³⁹⁾⁻⁴²⁾が多用された。GC 法は、抽出した試験液をガスクロマトグラフで分析を行うために試験溶液の溶媒を揮発性の高いヘキサンやアセトンに置換したり、また、対象化合物が極性物質の場合、これを誘導体化する必要もあり、操作が煩雑であった。また、バイオアッセイ法は、用いる微生物を適正に管理する必要があるうえ、正確に定量することが困難であり、蜂蜜のような抗菌性のある食品の場合、阻止円が形成され擬陽性の判断になってしまうケースも生じた。そのため、これらの方法に代わって HPLC を用いた分析法が多々発表されるようになってきたが、畜産食

品の筋肉部位に対する分析法の報告^{43)・46)}が多く、加工度の高い食品や内臓などを試験の対象にした試験法は少なかった。これは、脂肪やリン脂質といった試料由来のマトリックスの影響を受け、HPLCでの測定が非常に困難であったためである。それでも、LC-MSや質量分析部をタンデム化し、分析精度をさらに向上させたLC-MS/MSが食品分析の分野で多用されるようになるとその選択性、優れた分離能、検出感度の高さから畜水産食品を対象として様々な動物用医薬品の分析法が工夫、改良され、利用されることとなった。特にフロント部であるHPLCでの分離に用いる分析カラムの固定相の種類、また、その固定相に組み入れる官能基の種類も多様化し、さまざまな分離カラムが開発された^{47)・48)}。近年、その中においてもHPLCの分析には、不向きであった極性の高い化合物の分離に適した、親水性相互作用クロマトグラフィー（以下、HILIC, Hydrophilic interaction liquid chromatography）が広く使用されるようになった。HILICカラムは、シリカゲルなどの母材に極性の高い修飾基を結合させて水と有機溶媒の組み合わせによる分離モードである。それまでLCによる極性化合物の分析には、誘導体化⁴⁹⁾やイオンペア試薬^{50)・51)}を用いた分離手法が用いられてきた。しかし、誘導体化の操作は、煩雑で時間を要し、イオンペア試薬を用いた分離は、LC-MS/MSに用いられる試薬が限られ、また装置の安定に長い時間を費やす必要があった。図4には、HILICカラムに用いられる修飾基の例を示した。ジヒドロキシプロピル基(ジオール基)、カルバモイル基(アミド基)、ホスホリルコリン基などの極性基が基材となるシリカゲルに修飾された様々なHILICカラムが開発されている。HILICカラムは、親水性相互作用だけではなく、修飾された官能基によって水素結合、双極子相互作用、静電的相互作用など2次的相互作用も働くことから保持やピーク形状などに影響を与えられている。本研究においてもLC-MS/MSを試験法開発に用いるとともに、特異的な官能基を持つ固定相との組み合わせを選択し、高感度で選択性の高い分析法の開発を行った。

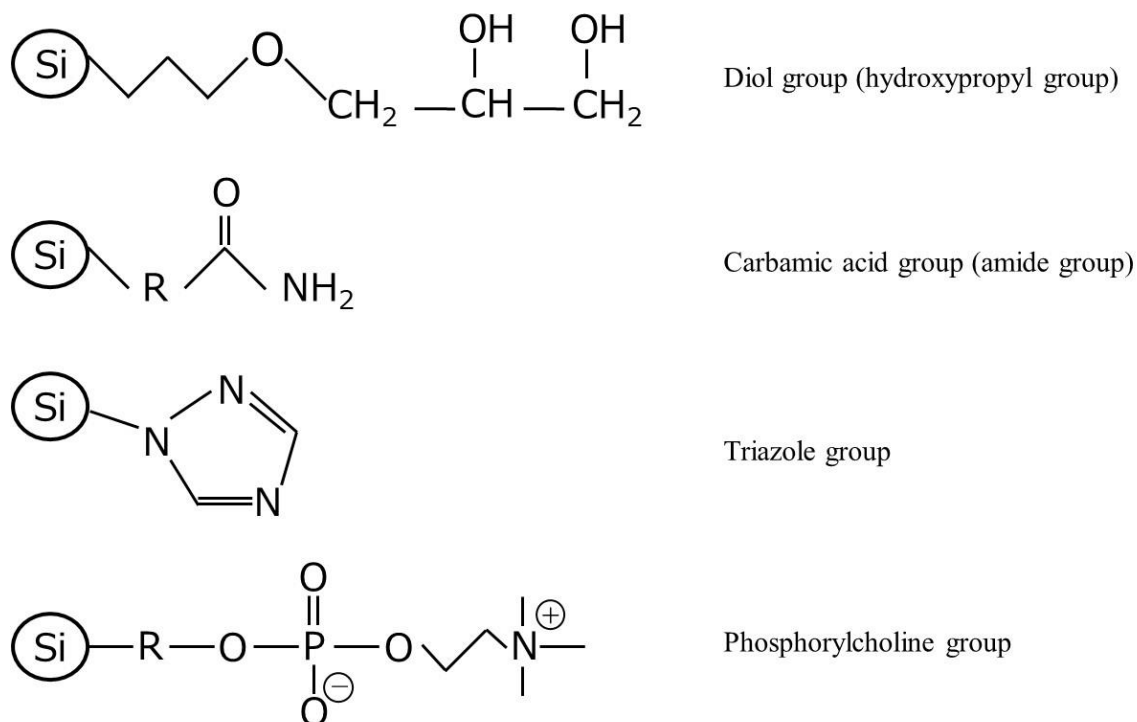


Fig.4. Types of functional groups to be modified on the stationary phase of HILIC columns

本研究では、食品中の化学物質（農薬、動物用医薬品、有害物質）を分析するにあたり、簡便に精度が良い分析法の作成に主眼をおき、LC-MS/MS を用いた分析法の開発を試みた。また、開発する分析法は、食品衛生行政において貢献できるよう幅広い食品への応用も可能な分析法を目標とした。

第1章では、抗ウイルス剤について、毎年流行している鳥インフルエンザの治療薬として海外で使用履歴のあるアマンタジンを含め、7種類の抗ウイルス剤の一斉分析法の開発に取り組んだ。今回、研究対象とした抗ウイルス剤は、多くが塩基性物質であるが、両性の極性物質も含んでおり、化学的性質の異なる複数の抗ウイルス剤の LC-MS/MS を用いた一斉分析法の開発は、分析時間の短縮とコスト削減をもたらし、結果的に多数の試験品を処理することが可能となった。

第2章ではトリアゾール系の殺菌剤である農薬のジニコナゾール分析法の開発およびβ2 アドレナリン作動薬である動物用医薬品のジルパテロール分析法の開発に取り組んだ。ジニコナゾールは、国内での農薬登録はされていないが海外での使用実績もあり、農産物だけではなく畜水産物も対象とした分析法の開発が必要であった。ジルパテロールは、スポーツ選手のドーピン

グ薬として用いられた事例⁵²⁾も話題となった。ジルパテロールは牛に与えることで脂肪の蓄積を抑制し、グリコーゲン分解およびタンパク質合成を介した筋肉増大作用により、飼育効率や肉質の改善が図れるとされている。しかし、牛以外への使用や残留事例もあり分析法を開発する必要があった。これら2剤は、国内に通知試験法がなく輸入畜産食品に残留していても対応することができなかったが、本研究の分析法が公定法となったことから、水際での応用ができることとなった。

第3章では、有害物質を対象とした分析法の開発を行った。ヒスタミンは、アレルギー様食中毒の原因物質としてよく知られている。特に水揚げから加工・製造工程などでの温度管理の不備により汚染した細菌によってヒスタミンが産生される可能性が高くなる。配合飼料に用いられる魚粉の原料には、生食用としての商品価値が低下したものや加工品の副産物（内臓、商品価値のない製品など）が用いられることもあり、ヒスタミン汚染が懸念される。ヒスタミンは、加熱処理などを行っても減少することがなく、配合飼料としての品質の劣化を招く結果となる。こうしたことから、本研究では、簡便な**LC-MS/MS**を用いた魚粉中のヒスタミン分析法を開発した。

トマト中のアルカロイドの一種であるトマチンは苦味物質として知られ、しばしば苦情の原因となる。トマトは、世界各地で様々な品種が栽培され、生食あるいは加工食品として利用されており、日本にも多くの加工品が輸入されている。生鮮果実中のトマチンに関する分析法は、**LC-MS/MS**を用いた方法も報告されているが、トマト加工品に関する報告はほとんどない。本研究では、加工品を含めたトマチンの分析法を開発するとともに加熱処理によるトマチンの消長についても検討を行った。これらの結果は苦情の原因解明の一助となるものと考えられる。

第1章 畜産物中の抗ウイルス剤の分析法に関する研究

第1節 LC-MS/MS による畜産物中の抗ウイルス剤の分析法

1. 緒言

我が国では、口蹄疫、豚熱、高病原性鳥インフルエンザなど 28 種の疾病が家畜伝染病予防法で指定されている。その中で近年、高病原性鳥インフルエンザ（以下、鳥インフルエンザ）が、社会的にも、食品衛生学的にも人の健康に対する大きな脅威となっている。1997 年、香港で鳥インフルエンザが発生し、その中で初めてヒトへの感染が確認され、人獣共通感染症の一つとして認識されることとなった。その後、鳥インフルエンザはアジアを中心に発生、流行し、新型インフルエンザとして社会的に大きな問題となった。2004 年には、日本国内でも鳥インフルエンザが確認された。

我が国では、鳥インフルエンザが発生した場合、「高病原性鳥インフルエンザ及び低病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針」⁵³⁾に基づいて対処され、発生源の農場からの家きん類の出荷制限と共にと殺、焼却処分を行うこととなっている。海外では鳥インフルエンザの予防や治療のためにワクチンや種々の抗ウイルス剤などの薬剤が使用される場合があるが、我が国では、ワクチンや抗ウイルス剤の使用は禁止されている。これは人に用いる抗インフルエンザウイルス剤が動物(家畜)に使用されることで薬剤耐性を持ったウイルスの出現が危惧されるからで、すでにアマンタジンに対する耐性を獲得したウイルスが存在することが知られている⁵⁴⁾。

一方、中国では鳥インフルエンザの治療にワクチンが使用されたといわれているが⁵⁵⁾、⁵⁶⁾、ウイルスの感染を完全には回避できず発症を抑える程度のものであるとされる⁵⁷⁾。また、発症前から予防薬として抗インフルエンザウイルス剤を使用することがあり、実際に中国の養鶏場で予防薬として使用されたと思われる抗ウイルス剤が鶏肉から検出された事例もある⁵⁸⁾、⁵⁹⁾。日本においてもヒト用抗インフルエンザウイルス剤をニワトリに投与して、治療効果が認められたとの報告もある⁶⁰⁾。

抗ウイルス剤の分析は、これまでは生体内の薬物の挙動に関する研究が中心であり、人や動物の血清⁶¹⁾、⁶²⁾、血漿⁶³⁾~⁶⁷⁾、尿⁶³⁾、⁶⁵⁾、⁶⁶⁾、⁶⁸⁾、唾液⁶⁶⁾、肝臓⁶⁹⁾などからの分析がほとんどである。食品からの分析法としては、Chan ら⁷⁰⁾、鶴岡ら⁷¹⁾による LC-MS/MS による分析法があるが、分析対象の抗ウイルス剤の数は単品あるいは 2、3 剤と少ない。一方、Berendsen ら⁷²⁾は LC-MS/MS による複数の抗ウイルス剤を対象にした分析法を報告しているが、抗インフルエンザウイルス剤以外の抗ウイルス剤も対象としており、その組み合わせも実際的ではない。また、いずれも鶏筋肉のみを分析対象としており、鶏加工品である唐揚げや焼き鳥などに利用される鳥の内臓部位や鶏卵な

どを対象としているものは少ない。

そこで今回、著者らは、鶏肉から検出事例もある⁵⁸⁾、アマンタジン、人のインフルエンザに汎用されるオセルタミビル、ザナミビルおよび近年、開発されたペラミビル、ラニナミビルや諸外国で使用実績のあるリマンタジンとウミフェノビル（アルビドール）の計7種の抗ウイルス剤のLC-MS/MSを用いた分析法の開発を行った。また、日本での消費量が多い、焼き鳥として食べられる鶏の内臓、唐揚げおよびゆで卵などの加工品への応用を行ったところ、若干の知見を得たので報告する。

2. 実験方法

2. 1. 試料

試料は、東京都内の小売店にて購入した鶏筋肉（岩手県産他）、鶏脂肪（国産）、鶏内臓（肝臓；四国産，心臓；宮城県産，砂肝；国産）、鶏卵（千葉県産）および鶏加工品を用いた。

2. 2. 試薬

標準品：アマンタジン塩酸塩は富士フィルム和光純薬(株)製、オセルタミビル、ウミフェノビル（以下、アルビドール，Arbidol）、ザナミビル、ペラミビル、ラニナミビルは Toronto Research Chemicals 社製、1-(1-アダマンチル)エチルアミン塩酸塩（リマンタジン塩酸塩）は Sigma Aldrich 社製を用いた。各抗ウイルス剤の構造式を図1に示した。

アマンタジン、リマンタジン、アルビドール、オセルタミビルおよびペラミビル各標準原液：それぞれ 10 mg 相当を精秤し、メタノールに溶解して 100 mL とした（100 µg/mL）。

ザナミビル標準原液：10 mg 相当を精秤し、水に溶解して 100 mL とした（100 µg/mL）。

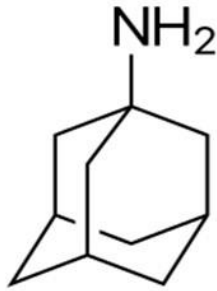
ラニナミビル標準原液：10 mg を精秤し、メタノール-水（1：1）に溶解して 100 mL とした（100 µg/mL）。

混合標準溶液：各標準原液の 10 mL をとって混合し、メタノールで 100 mL としたものを混合標準溶液とした（10 µg/mL）。

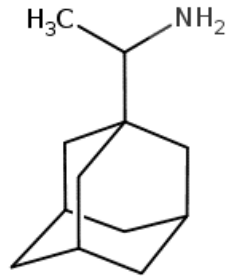
固相抽出カラム：InertSep MCX（500 mg/6 mL）（以下 SCX ミニカラムとする）（GLサイエンス(株)製）、InertSep MAX（500 mg/6 mL）（以下 MAX ミニカラムとする）（GLサイエンス(株)製）を使用した。SCX ミニカラムおよび MAX ミニカラムはあらかじめメタノール 10 mL でコンディショニングしたものを用いた。

その他の試薬：メタノールは関東化学(株)製の LC-MS 用、富士フィルム和

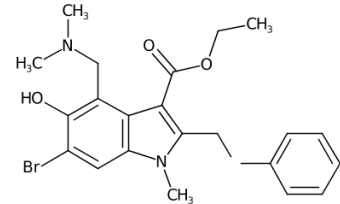
光純薬(株)製の高速液体クロマトグラフィー用、アセトニトリルは関東化学(株)製 LC-MS 用、酢酸は富士フィルム和光純薬(株)製の高速液体クロマトグラフィー用を用いた。



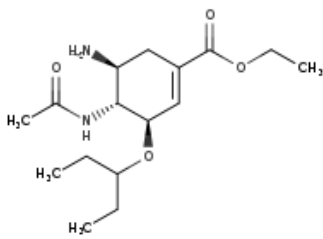
Amantadine
M.W.: 151.25



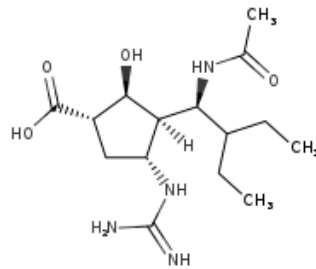
Rimantadine
M.W.: 179.30



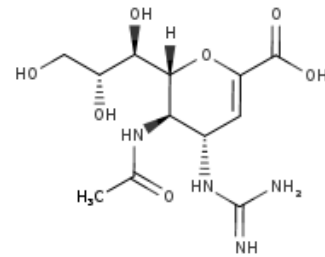
Umifenovir (Arbidol)
M.W.: 477.42



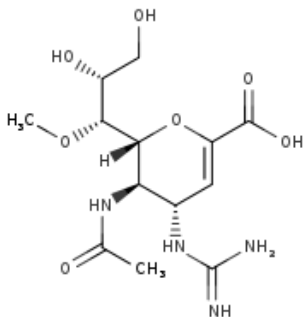
Oseltamivir
M.W.: 312.40



Peramivir
M.W.: 328.41



Zanamivir
M.W.: 332.31



Laninamivir
M.W.: 346.34

Fig. 1. Structures of analytes

2. 3. 装置

ホモジナイザーは SMT COMPANY 社製マルチディスパーサー PB-95、遠心分離機は KUBOTA 社製ユニバーサル冷却遠心機 5930、ロータリーエバポレーターは BUCHI 社製有機溶媒回収装置 V-703 を用いた。高速液体クロマトグラフは島津製作所製 LC-20、質量分析装置は SCIEX 社製 API-5500QTRAP を使用した。

2. 4. 測定条件

LC-MS/MS の操作条件を表 1 に示した。

Table 1. LC-MS/MS operating conditions

Parameter	Setting															
LC Conditions																
LC column	ZIC-HILIC (2.1 mm i.d.×150 mm,3.5 μm)															
Mobile phase	A=1 vol% acetic acid B=1 vol% acetic acid in acetonitrile															
Linear gradient elution																
	<table border="1"><thead><tr><th>Time(min)</th><th>A(%)</th><th>B(%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>20</td><td>80</td></tr><tr><td>5</td><td>20</td><td>80</td></tr><tr><td>15</td><td>50</td><td>50</td></tr><tr><td>25</td><td>50</td><td>50</td></tr></tbody></table>	Time(min)	A(%)	B(%)	0	20	80	5	20	80	15	50	50	25	50	50
Time(min)	A(%)	B(%)														
0	20	80														
5	20	80														
15	50	50														
25	50	50														
Flow rate	0.2 mL/min															
Column temperature	40°C															
Injection volume	10 μL															
Run time	35 min															
MS Conditions																
Ionization mode	ESI(positive mode)															
Ion spray voltage	5,500V															
Curatin gas (N ₂)	50 psi															
Desolvation temperture	400°C															
Collision gas	8 psi															
Ion source gas 1	50 psi															
Ion source gas 2	50 psi															

2. 5. 検量線の作成

混合標準溶液をアセトニトリル-メタノール-1%酢酸(8:1:1)混液で希釈し、0.00005~0.010 mg/L の濃度範囲の標準溶液を調製し、それぞれ 10 μL を LC-MS/MS に注入した。得られたクロマトグラムから各抗ウイルス剤のピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。

2. 6. 試験溶液の調製

2. 6. 1. 抽出

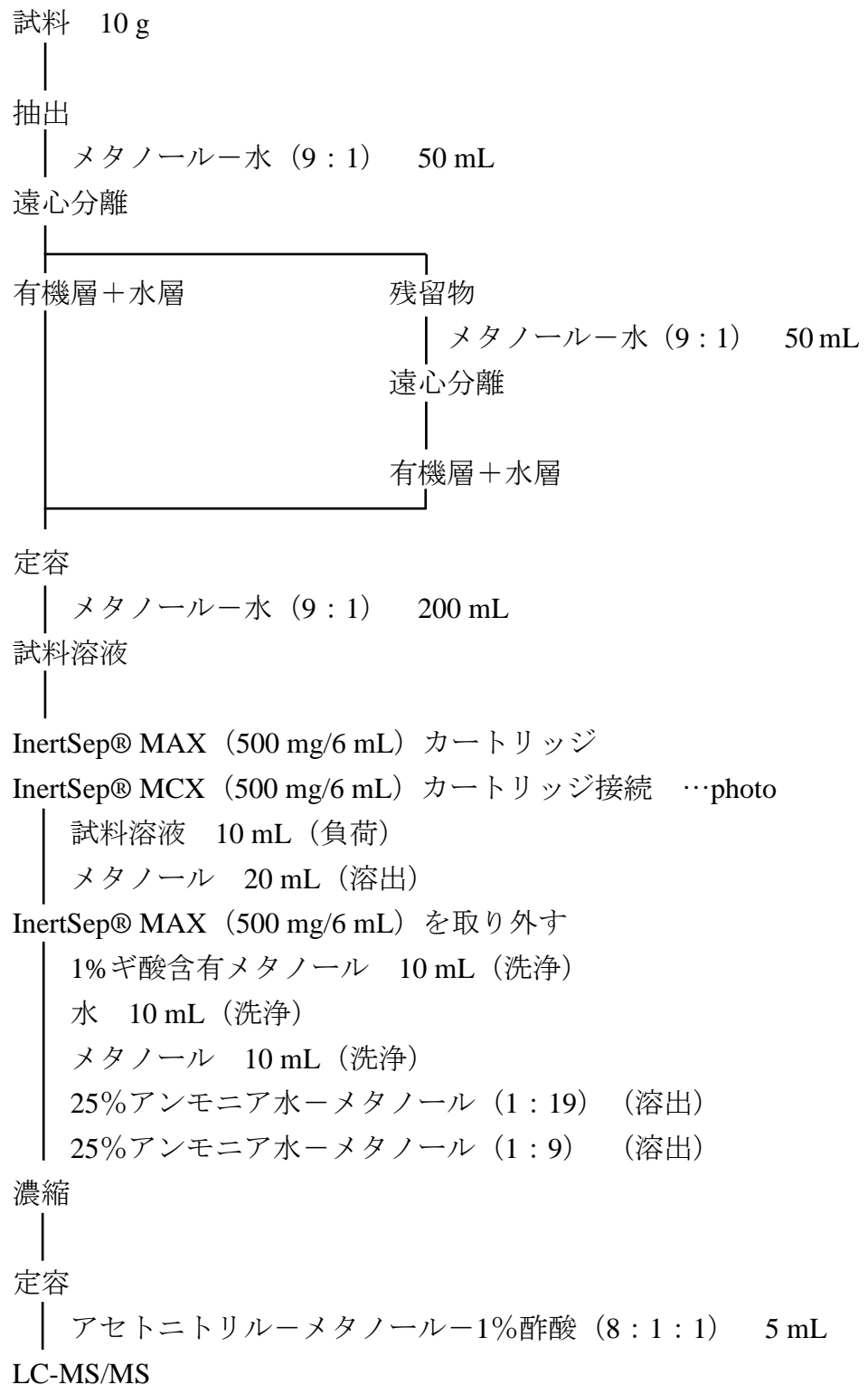
試料 10 g を 100 mL のポリプロピレン製遠心分離管に秤量した。そこに、メタノール-水 (9 : 1) を 50 mL 加え、ホモジナイザーで攪拌後、3,000 rpm (1,880 × g)、4°C で 10 分間遠心分離を行った。得られた上清を 200 mL メスフラスコに分取した。残渣にメタノール-水 (9 : 1) を 50 mL 加えてホモジナイザーで攪拌後、同様に遠心分離を行った。得られた上清をメスフラスコに合わせ、メタノール-水 (9 : 1) を用いて正確に 200 mL に定容したものを試料溶液とした。

2. 6. 2. 精製

あらかじめメタノール 10 mL でコンディショニングした InertSep MAX カートリッジおよび InertSep MCX カートリッジを InertSep MAX カートリッジが上になるように連結した (タンデムカラム)。これに、6. 1 の抽出操作で得られた試料溶液の 10 mL を負荷した。さらにメタノール 20 mL を流して溶出させのち、InertSep MAX カートリッジを外した。残った InertSep MCX カートリッジを 1%ギ酸含有メタノール、水およびメタノールそれぞれ 10 mL で洗浄した。その後、25%アンモニア水-メタノール (1 : 19) および 25%アンモニア水-メタノール (1 : 9) の順にそれぞれ 10 mL を流し、抗ウイルス剤を溶出した。

溶出液を減圧下、溶媒留去して得られた残渣をアセトニトリル-メタノール-1%酢酸 (8 : 1 : 1) 混液 5 mL で溶解したものを試験溶液とした。

分析操作を Scheme 1 に示した。



Schem 1. Analytical procedures for antiviral agent in chicken muscle

2. 7. 定量

得られた試験溶液を表 1 に示した LC-MS/MS の操作条件により、測定を行い、得られたピーク面積から絶対検量線により各抗ウイルス剤の定量を行った。

3. 結果および考察

3. 1. 測定条件の検討

3. 1. 1. MS 条件の検討

各抗ウイルス剤を LC-MS/MS で測定するための MS 条件の検討を既報⁷³⁾⁻⁷⁵⁾を参考に行った。イオン化モードについてはエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を用いることとした。測定モードを選択するために、インフュージョン測定を行ったところ、すべての抗ウイルス剤でプロトン付加分子が強く検出された。次に、それぞれのプロトン付加分子をプリカーサーイオンとして、Selected Reaction Monitoring (SRM) モードでの測定条件を検討した結果、衝突誘起解離によって、それぞれプロダクトイオンが検出された。図 2 に各抗ウイルス剤のマスペクトルを示す。図に示す点線 A (—) で定量イオン、点線 B (—) で定性イオンとなる部位が脱離したものと考えられた。すなわち、アマンタジンおよびリマンタジンは、アミノ基が脱離したと考えられるそれぞれ、 m/z 152.5→134.9 および m/z 180.1→163.1 を定量イオンとした。しかし、アマンダジンとリマンダジンで用いた定性イオンは、さらにアダマンタン骨格が開裂して生じたものと考えられるが生成イオンの構造を推測することはできなかった。アルビドールは、点線 A でエステル結合が開裂した m/z 479.0→434.0 を定量イオンに、さらに点線 B でインドール基が脱離し、ジメチルアミノ基が残っていると考えられる骨格を持つ m/z 479.0→280.9 を定性イオンとすることにした。ラニナミビルは、点線 A でヒドロキシ基のある $C_2H_5O_2$ が脱離したと考えられる m/z 347.1→60.1 を定量イオンに、点線 B でアセトアミド基とグアニノ基が脱離したと考えられる m/z 347.1→121.0 を定性イオンとすることにした。オセルタミビルは、点線 A でアセチルアミンおよびエチルプロポキシ基が脱離したと考えられる m/z 313.1→166.1 を定量イオンに、さらに点線 B でエトキシ基が脱離したと考えられる m/z 313.1→120.1 を定性イオンとすることにした。ペラミビルは、点線 A でグアニノ基が脱離したと考えられる m/z 329.2→270.1 を定量イオンに、点線 B で開裂して生成したエチルプロポキシ基を持つアミンと考えられる m/z 329.2→100.1 を定性イオンとすることにした。ザナミビルは、点線 A で開裂したピラン環の 6 位にある側鎖のプロピル基の一部が残ったものと考えられる m/z 333.1→60.0 を定量イオンに、点線 B の開裂で剥離したピラン環とカ

ルボキシル基に由来する考えられる m/z 333.1→121.0 を定性イオンとすることにした。それぞれのモニターイオンに最適な条件を表 2、それぞれのマス chromatogram を図 3 に示した。

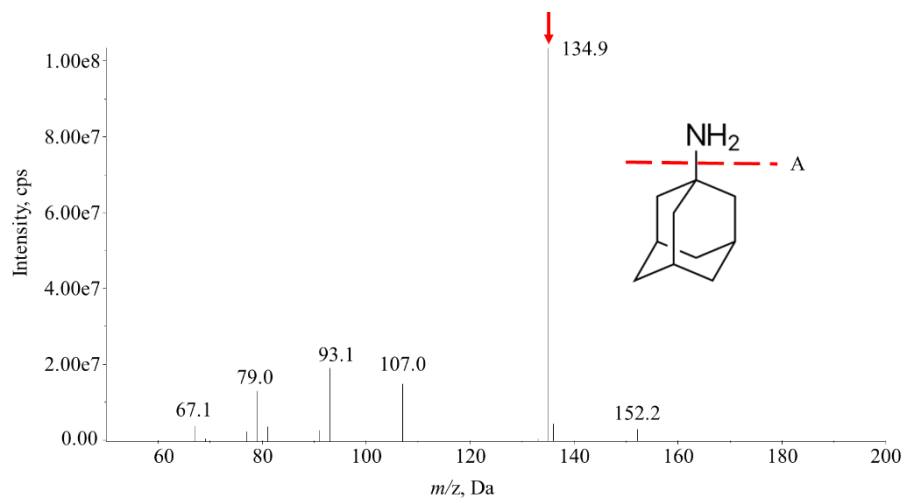
Table 2. SRM parameters of analytes

	precursor m/z	product m/z	DP ^{※1} (V)	CE ^{※2} (eV)	CXP ^{※3} (V)
Amantadine	152.5	134.9 ^{a)}	96	18	6
	152.5	79.0 ^{b)}	96	39	12
Rimantadine	180.1	163.1 ^{a)}	96	23	14
	180.1	120.1 ^{b)}	96	37	14
Arbidol	479.0	434.0 ^{a)}	66	23	20
	479.0	280.9 ^{b)}	66	45	14
Laninamivir	347.1	60.1 ^{a)}	136	21	8
	347.1	121.0 ^{b)}	136	35	28
Oseltamivir	313.1	166.1 ^{a)}	96	23	14
	313.1	120.1 ^{b)}	96	37	12
Peramivir	329.2	270.1 ^{a)}	81	25	14
	329.2	100.1 ^{b)}	81	40	14
Zanamivir	333.1	60.0 ^{a)}	126	21	8
	333.1	121.0 ^{b)}	126	37	16

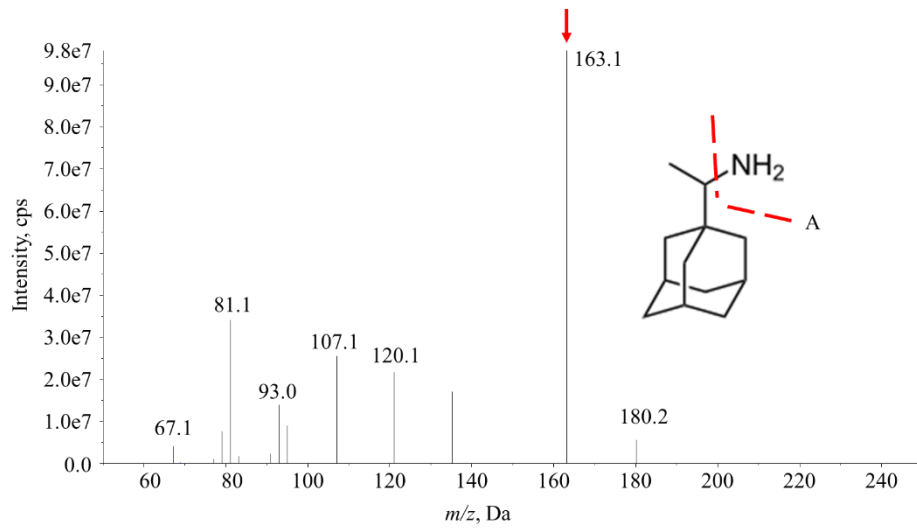
※1 Declustering potential ※2 Collision energy ※3 Collision cell exit potential

a) Used for a quantitative analysis b) Used for a qualitative analysis

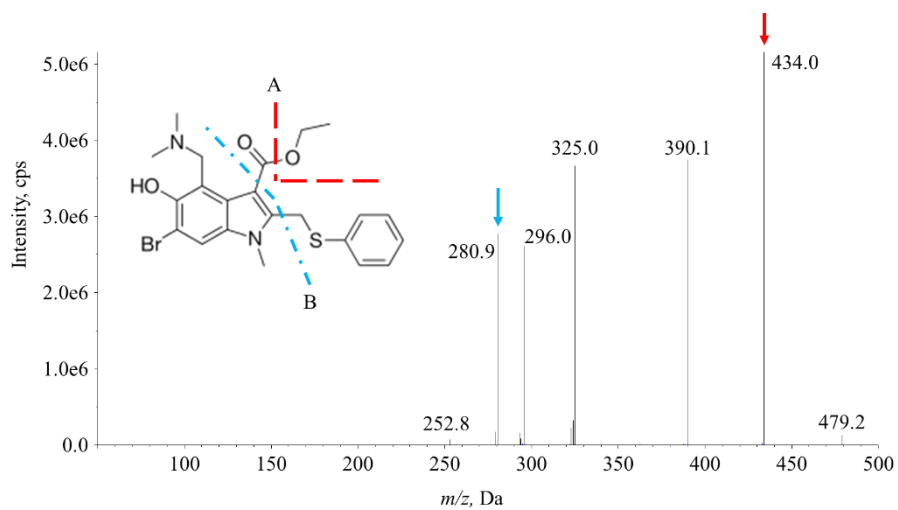
① Amantadine



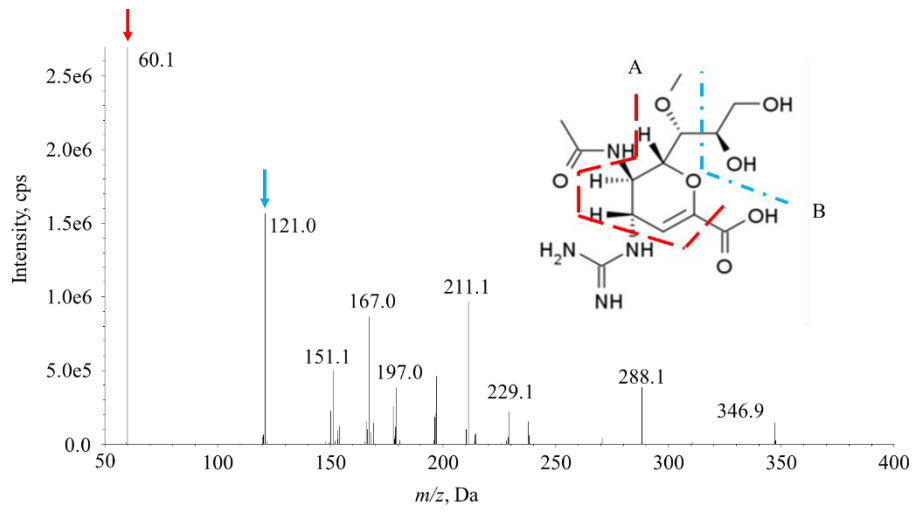
② Rimantadine



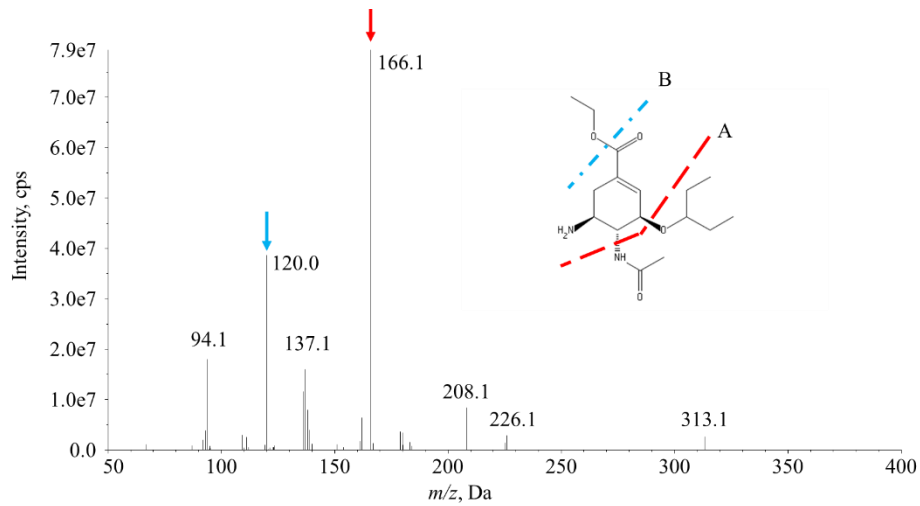
③ Arbidol



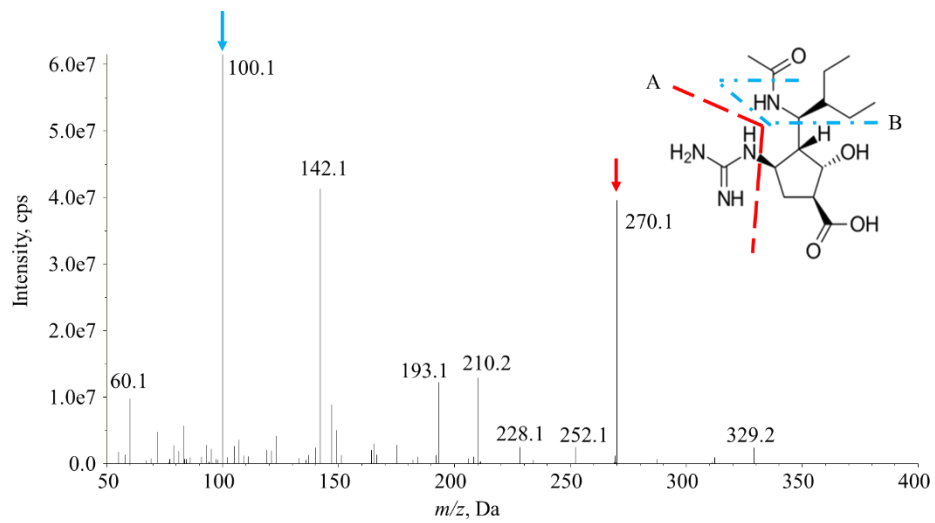
④ Laninamivir



⑤ Oseltamivir



⑥ Peramivir



⑦ Zanamivir

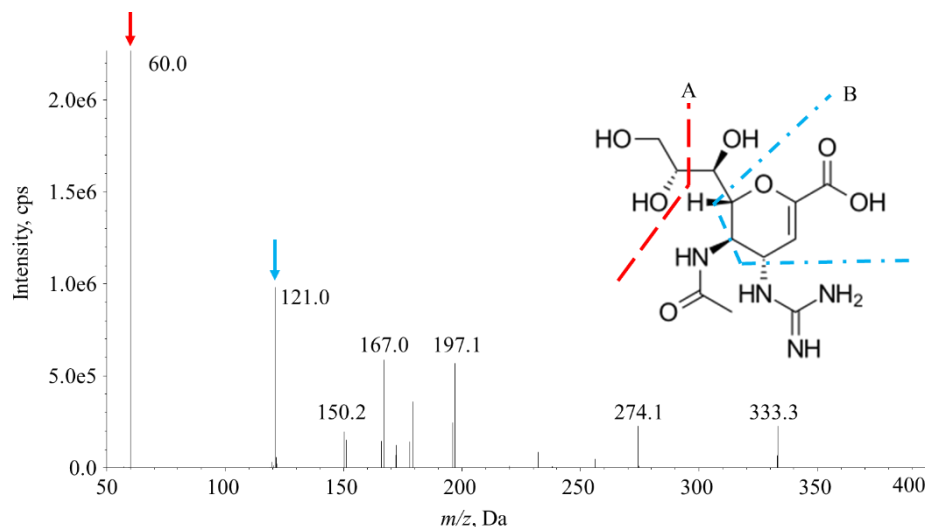


Fig. 2. Mass spectrum of antiviral agent

- ① Amantadine, ② Rimantadine, ③ Arbidol, ④ Laninamivir, ⑤ Oseltamivir,
⑥ Peramivir, ⑦ Zanamivir

3. 1. 2. LC 条件の検討

これまで報告されている抗ウイルス剤の分析における LC カラムとしては、逆相系のカラム (ODS) が多く用いられている⁷³⁾⁻⁷⁶⁾。そこで、いくつかの一般的な ODS 系のカラムについて検討したが、保持時間が早いものから遅いものまで幅があり、また、テーリングするなどピークの形状もよくない化合物もあった。ODS 系のカラムで 7 種類の抗ウイルス剤を一斉に測定することは困難であった。次に、対象とした抗ウイルス剤が塩基性物質または両性物質であることから、分析カラムとしてスルホン基を修飾した陽イオン交換カラムについて検討を行った。

陽イオン交換カラムでは ODS 系のカラムと比較して、全体的に保持時間の幅が狭まったが、ラニナミビル、ザナミビルのピーク形状がテーリングするなど悪かった。そこで、近年、極性物質の分析に用いられるようになった親水性相互作用を有する Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) カラムを用いて検討した。移動相には HILIC 分析で広く使われるアセトニトリル-水系を用いた。HILIC カラムは、その固定相の種類により溶出挙動が異なることから、Inertsil Amide、Inertsil HILIC (以上、GL サイエンス社製)、Triart Diol-HILIC (YMC 社製)、PC HILIC (大阪ソーダ社製)、ZIC-HILIC (メルク社製) などの HILIC カラムについて先に示した操作条件に従い各抗ウイルス剤の検出状況を検討した。その結果、各ピークの分離や形状および MS 感度は、ZIC-

HILICが最適であることが分かった。ZIC-HILICは図3に示す通り、他のHILICカラムと同じように親水性の官能基を持つため、基材の表面に水和層が形成されることにより、親水性の分配が働いていると考えられる。また、ベタイン構造を持つスルフォベタイン基が修飾されており、2次的相互作用として、アミノ基を持つ抗ウイルス剤との静電的相互作用による分配が考えられる。一方で、スルフォベタイン基が両性イオンであるため、スルフォベタイン基の4級アミンによって、両性物質であるラニナミビル、ザナミビルのカルボキシル基との相互作用が働き、保持が強まることにより保持時間が安定し、良好なクロマトグラムが得られたと考えられた。

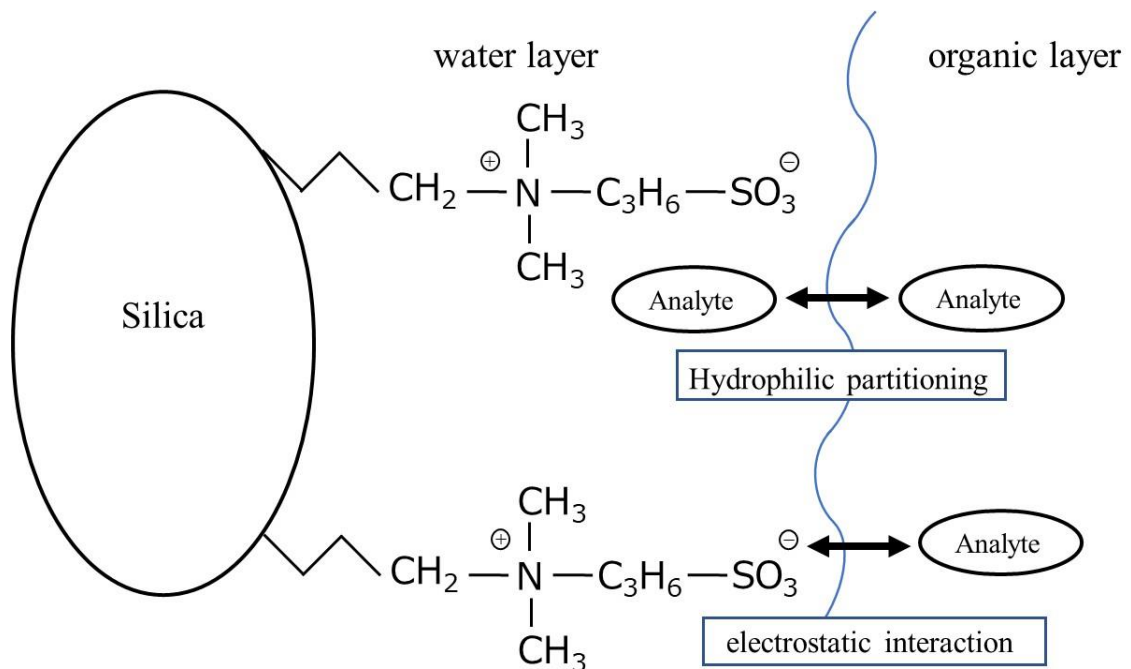


Fig. 3. ZIC-HILIC column retention mechanism

移動相の溶媒系としてはアセトニトリルとメタノールについて検討を行った。LC-MS/MSの移動相の添加剤としては広く使用され、7種の抗ウイルス剤のイオン化促進に最適なギ酸、酢酸、ギ酸アンモニウムを用いて種々検討を行った。その結果、添加剤には溶出状況が最も良好であった酢酸を用いることとし、その添加濃度について検討した。すなわち、酢酸を3濃度(0.5、1および2%)、有機溶媒として同濃度の酢酸含有アセトニトリルおよびメタノールとの組み合わせについて検討した。その結果、1%酢酸含有アセトニトリル-1%酢酸を移動相とするグラジエント溶離を行った場合に最も良好なピー

ク形状、感度が得られた、以上の結果より、本法ではカラムとして ZIC-HILIC、移動相には 1%酢酸含有アセトニトリル—1%酢酸のグラジエントによる分析条件を採用することとした。図 4 に 7 種類の抗ウイルス剤混合標準溶液の TIC クロマトグラムを示した。TIC では、リマンタジンとオセルタミビルの保持時間が近似したが、SRM において良好に分離することも確認できた(枠内)。また、作成した条件で検量線を作成したところ、決定係数 (R²) は、すべての抗ウイルス剤で 0.999 以上と良好であった。

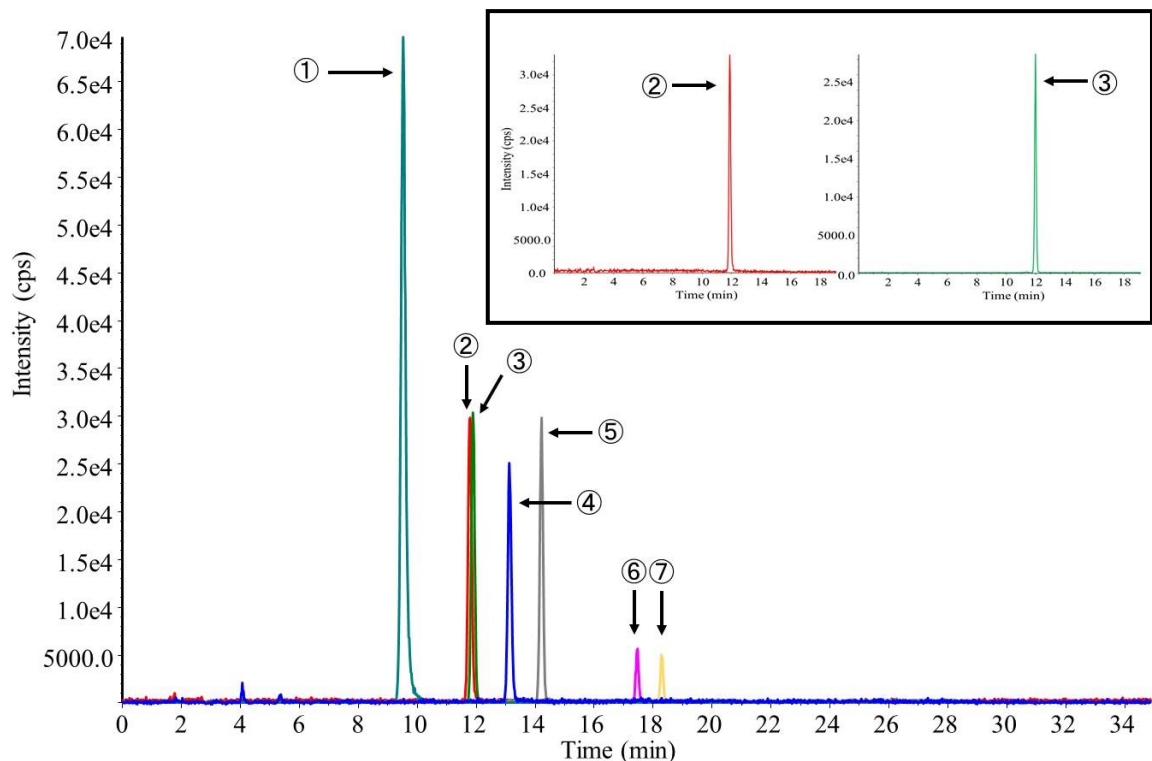


Fig. 4. TIC chromatogram of antiviral agent standard solutions (concentration: 0.005 mg/L)
 ① Arbidol, ② Rimantadine, ③ Oseltamivir, ④ Amantadine, ⑤ Peramivir,
 ⑥ Laninamivir, ⑦ Zanamivir
 Insets show expanded views of the rimantadine (②) and oseltamivir (③) peaks (concentration: 0.001 mg/L).

3. 2. 試験溶液の調製

3. 2. 1. 抽出法

食品中からの塩基性物質である抗ウイルス剤の抽出には、アセトニトリルやメタノールとこれらに水や酸を加えた極性溶媒⁷⁶⁾⁻⁷⁸⁾の他、マキルベン緩衝液⁶⁹⁾などを用いた報告もある。しかし、今回の分析対象である抗ウイルス剤

の多くは塩基性物質であるが、ペラミビル、ザナミビルおよびラニナミビルは分子構造中にカルボキシル基を有する両性物質である。そこでこのように化学的性質が大きく異なる抗ウイルス剤を効率よく抽出できる溶媒系について検討した。鶏の筋肉をペースト状にした試料 10 g にそれぞれの抗ウイルス剤 0.1 μg を添加し、抽出溶媒としてメタノール、アセトニトリル、酢酸エチル、アセトン、アセトニトリル-*n*-ヘキサン混液およびメタノール-アセトニトリル混液を用いてそれぞれの抽出率について比較検討した。

その結果、メタノールおよびアセトンで 80% 以上の比較的良好な回収率が得られた。そこで、抗ウイルス剤の抽出として報告^{70), 77)}がある有機溶媒に水を加えた混液での抽出率について検討した。比較的良好な回収率が得られたメタノールおよびアセトンとこれに水を加えた混液のメタノール-水 (95 : 5)、メタノール-水 (9 : 1)、メタノール-水 (8 : 2)、アセトン-水 (95 : 5)、アセトン-水 (9 : 1) およびアセトン-水 (8 : 2) 混液について抽出率を調べたところ、メタノール-水 (9 : 1) ですべての抗ウイルス剤で 90% 以上の良好な回収率が得られた。しかし、各抗ウイルス剤はその置換基に違いがあるため、抽出溶媒の pH による影響について検討を行った。

その結果、pH の影響による抽出効率に違いがみられなかったため、抽出溶媒にはメタノール-水 (9 : 1) を用いることとした。

3. 2. 2. 固相抽出カラムによる精製

今回の分析法は、鶏肉だけではなくその加工品や鶏卵を対象としている。そのため、測定において脂質などの低極性成分やその他の食品由来成分の影響が懸念されたことから、精製工程の必要であると考えられた。

抗ウイルス剤の精製は、一般的には逆相系固相抽出カラムの C18⁷⁶⁾あるいは、塩基性化合物のアマンタジンやリマンタジンを測定対象にしている報告では、陽イオン交換系固相抽出カラム^{73), 75)}を使用していることが多い。

一般的にミニカラムは図 5 に示した通り、負荷溶媒などでコンディショニングしたカラムに目的物質を含む溶液を負荷した後、夾雑物と親和性のある溶媒で洗浄を行い、その後、目的物質を溶出させることで精製を行う。

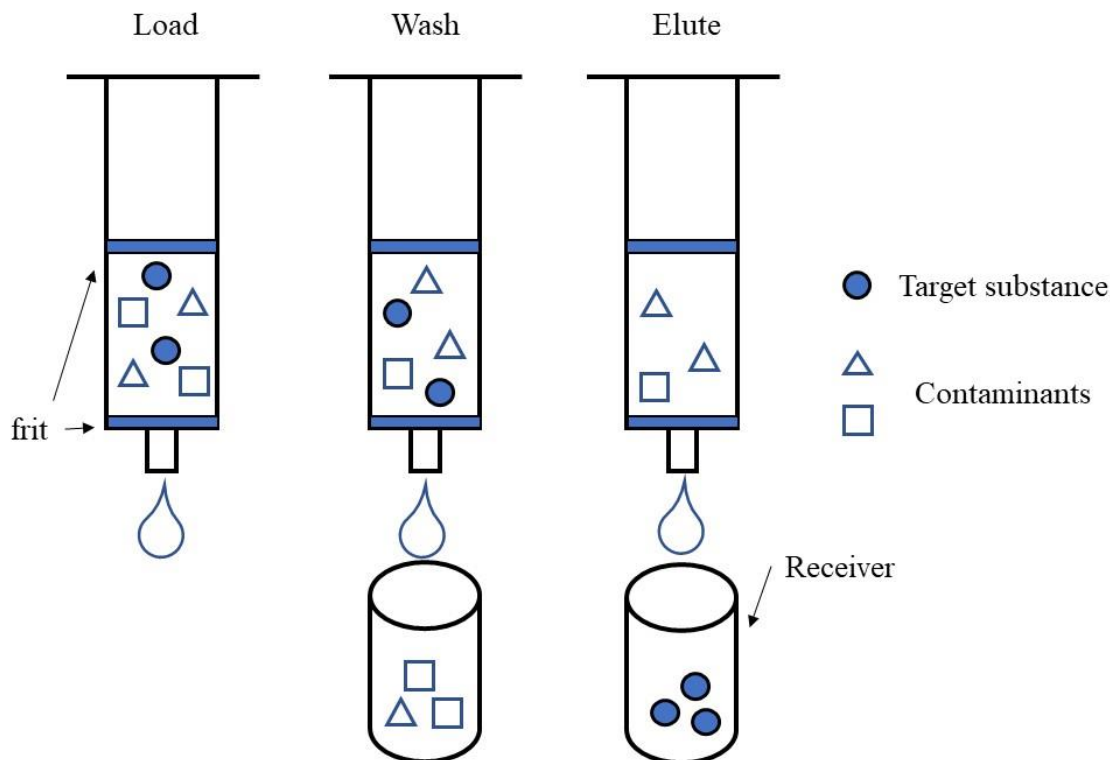


Fig. 5. Purification process flow using solid phase cartridge

まず、今回分析対象とした抗ウイルス剤はほとんどが塩基性物質または両性物質であるため、精製には、無極性固相の C18, PH のミニカラムに比べ選択性が高いイオン交換系のカラムを用いる方が、精製効果が大いと考えられた。そこで、強陽イオン交換系の InertSep MCX カートリッジを用いて各抗ウイルス剤の挙動について調べた。まず、メタノールで調製した抗ウイルス剤の 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 混合標準溶液 5 mL を InertSep MCX カートリッジに負荷したところ、抗ウイルス剤はいずれも良好に保持された。次に、イオン性の夾雑物等を除去する目的で InertSep MCX カートリッジに 1%ギ酸-メタノール、水およびメタノールそれぞれ 10 mL を用いて洗浄したところ、洗浄液に抗ウイルス剤はいずれも検出されず、十分に保持されていた。

なお、一般的に汎用される固相抽出カラムである逆相系の InertSep C18 カートリッジおよびポリマー系の OASIS HLB カートリッジについても適用の検討を行った。抗ウイルス剤の 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 混合標準溶液を水、アセトニトリルおよびメタノールで調製し、それぞれのカラムに各々 1 mL 負荷したところ、いずれのカラムにもラニナミビル、ザナミビルおよびペラミビルは保持されなかった。これらは両性の極性物質であったため、カラムに保持されなかつ

たものと考えられた。

次いで **InertSep MCX** カートリッジからの溶出溶媒について検討した。溶出溶媒として、25%アンモニア水-メタノール混液を用いて、その混合比率を変え 5 mL ずつの溶出状況について調べた。

その結果、図 6 示す通り、25%アンモニア水-メタノール(1:19) (図 6(1))、25%アンモニア水-メタノール (1:9) (図 6(2))では、ラニナミビルとザナミビルを十分に溶出することができなかった。しかし、**InertSep MCX** カートリッジからの抗ウイルス剤の溶出に、まず 25%アンモニア水-メタノール (1:19) 10 mL を流し、次いで 25%アンモニア水-メタノール (1:9) 10 mL を段階的に用いたところラニナミビルとザナミビルの回収率が良くなることが判明した(図 6(3))。これは、ラニナミビルとザナミビルが両性物質であるためカラム内での溶出溶媒の極性の変化によって溶出挙動に変化が生じたと考えられた。また、ザナミビル及びラニナミビルの **LogP** が同程度であることから同じような挙動を示したと考えられた。

次に、実試料として鶏の脂肪での適用を試みたところ、**InertSep MCX** カートリッジのみでは精製が十分ではなかった。そこで、精製効果を高めるため、追加の精製を検討した。今回、分析対象が塩基性物質や両性物質であるため、イオン性の物質が妨害となると考えられた。そこで、追加するカラムとして、強陰イオン交換系の **InertSep MAX** カートリッジを用いた。

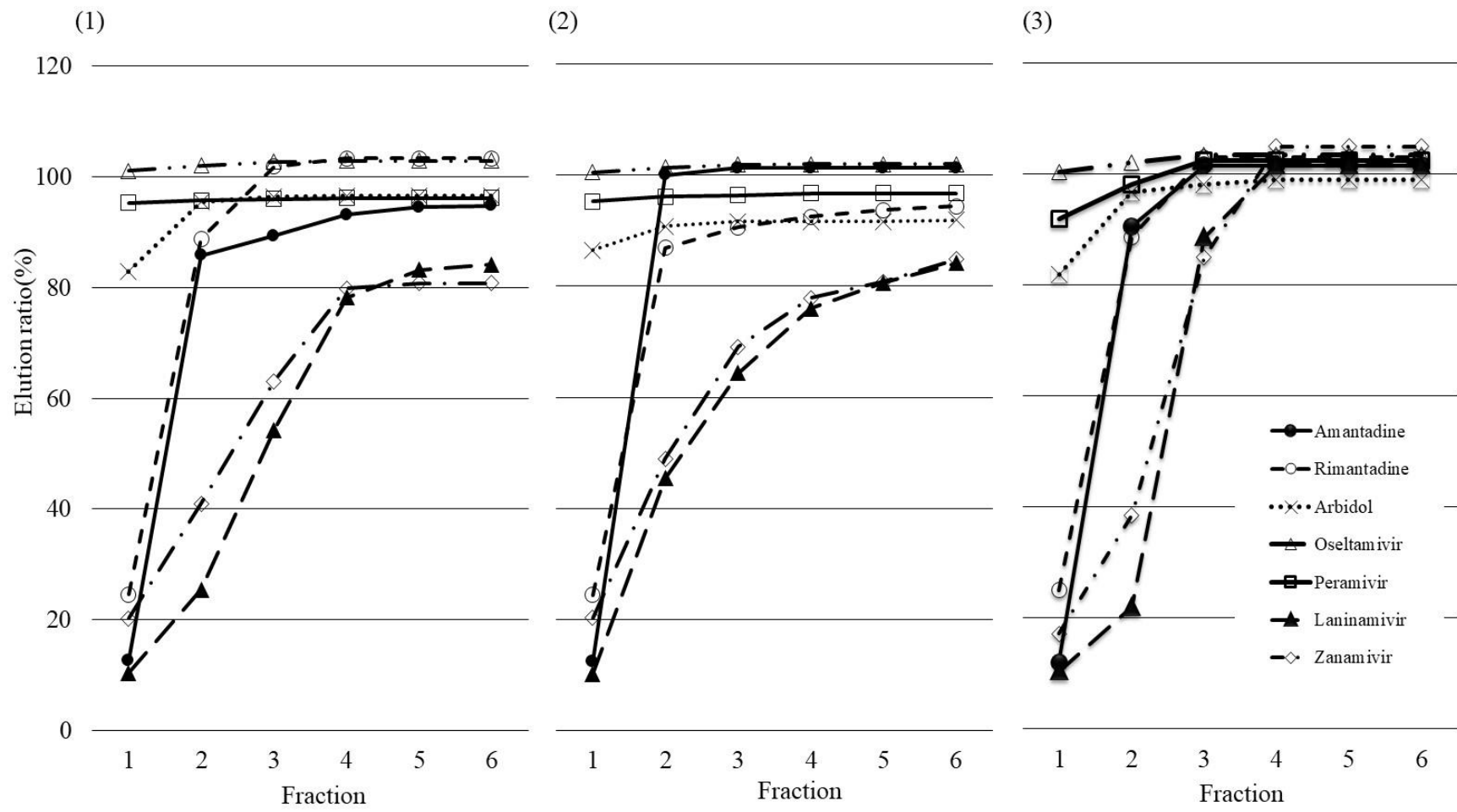


Fig. 6. Recovery of antiviral agents from each fraction of different solvents used for elution from the InertSep[®] MCX cartridge

Five milliliters of standard solution (0.1 mg/L in methanol) was loaded onto the InertSep[®] MCX cartridge and washed with 1% HCOOH-methanol, water, and methanol. It was then eluted with solvents at various ratios of 25% ammonia-methanol. Five milliliters of each fraction was collected and the recovery of each antiviral agent was assessed. The ratios of 25% ammonia-methanol used for elution are as shown in (1) to (3) below. n=3

- (1) Collected six fractions of 5 mL each of 25% ammonia-methanol (1:19).
- (2) Collected six fractions of 5 mL each of 25% ammonia-methanol (1:9).
- (3) Collected two fractions of 5 mL each of 25% ammonia-methanol (1:19), and then four fractions of 5 mL each of 25% ammonia-methanol (1:9).

まず、メタノール-水 (9 : 1) で調製した 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の混合標準液 1mL をメタノール-水 (9 : 1) 10mL に加え、InertSep MAX カートリッジに負荷した。その結果、一部の抗ウイルス剤がカラムに残留したが、さらにメタノール 20 mL を流すことで、すべての抗ウイルス剤を溶出することができた。この InertSep MAX カートリッジからの溶出液を InertSep MCX カートリッジに負荷したところ、すべての抗ウイルス剤が InertSep MCX カートリッジに保持された。さらに、実試料としてメタノール-水 (9 : 1) で抽出した鶏脂肪の試料溶液に、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の混合標準液を 1mL 添加して、InertSep MAX カートリッジからの溶出を確認した。一方、InertSep MAX カートリッジにはリン脂質と思われる黄色のバンドが観察され、不純物が InertSep MAX カートリッジに保持されていることが示唆された。

これらの結果から、写真のように InertSep MAX カートリッジ (上段) と InertSep MCX カートリッジ (下段) を組み合わせたタンデムカラムを用いて精製することとした。

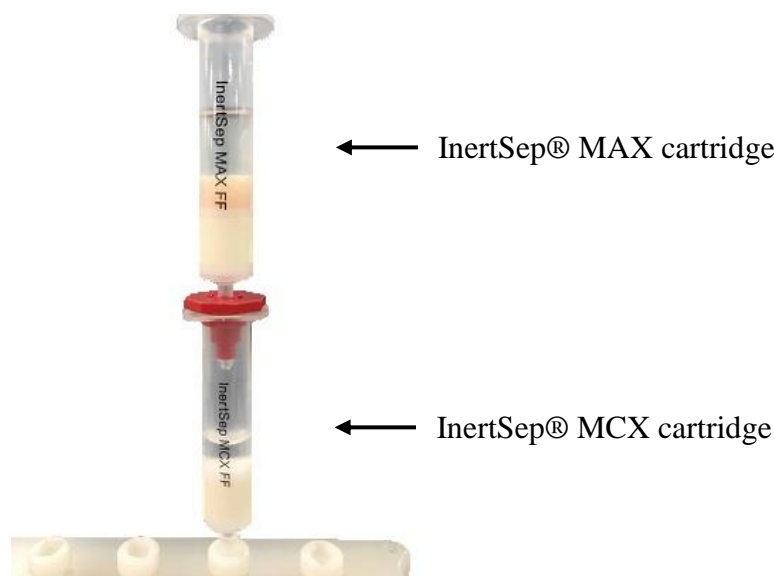


Photo. InertSep® MAX cartridge (top) and InertSep® MCX cartridge (bottom) connected in tandem

このタンデムカラムを用いた精製は、図 7 示す通り、SRM のクロマトグラムに分析の妨げとなる夾雑物のピークが小さくなる効果を示した。また、マトリックスの影響もリマンタジンで 0.75 から 0.95 に改善した。回収率も 90% 以上と良好な結果であった。

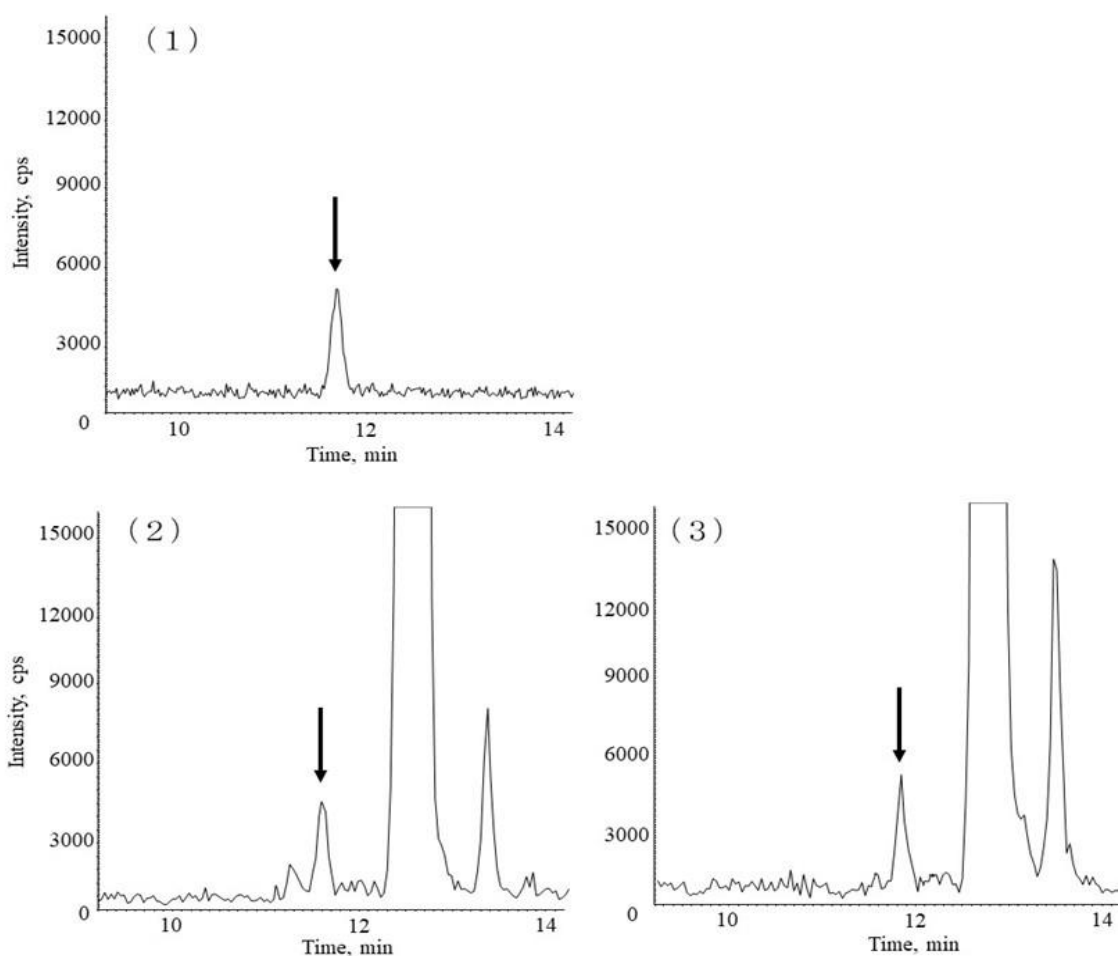


Fig. 7 Effects of purification using the tandem column on SRM chromatograms of rimantadine in the sample solution extracted from chicken fat

- (1) Rimantadine standard solution (0.001 mg/L)
- (2) Purification with the InertSep MCX[®] Cartridge
- (3) Purification using the tandem column of the InertSep MCX[®] cartridge and InertSep MAX[®] cartridge

3. 3. 添加回収実験

鶏筋肉、鶏脂肪、鶏肝臓、鶏心臓、鶏砂肝（砂囊）および鶏卵の計6種の試料をペースト状にした後、一律基準値(0.01 mg/kg)に相当する抗ウイルス剤混合標準溶液を添加し、30分間室温で放置したのち、抽出操作を行った。測定の結果を表3に示した。6試料における試行数5回における真度は、77.9～97.5%、併行精度は1.7～9.2%であった。また、焼き鳥、唐揚げおよびゆで卵などの加工品9試料に対して添加回収試験を行った。その結果、表4に示した通り、真度は、72.6～99.2%、併行精度は3.0～11.2%であった。図8①～④に各抗ウイルス剤と鶏脂肪の代表的なSRMクロマトグラムを示した。検討し

たすべての試料において分析の支障となるピークは認められなかった。

Table 3. Recovery of antiviral agents from chicken tissues and eggs

Sample	Recovery(%) ^{※1} (Repeatability(%), Matrix effect ^{※2})						
	Amantadine	Rimantadine	Arbidol	Laninamivir	Oseltamivir	Peramivir	Zanamivir
Muscle	94.8 (2.8 , 0.94)	93.1 (5.5 , 0.92)	92.3 (8.3 , 0.96)	88.5 (5.5 , 0.94)	97.5 (3.2 , 0.99)	84.4 (3.1 , 0.92)	88.1 (1.7 , 0.94)
Fat	81.1 (7.7 , 0.99)	80.8 (7.7 , 0.98)	86.7 (6.4 , 0.90)	85.1 (6.5 , 1.00)	86.2 (7.8 , 1.01)	89.7 (7.8 , 1.04)	87.6 (6.7 , 1.01)
Liver	81.8 (4.7 , 0.92)	82.7 (8.7 , 0.95)	83.2 (6.4 , 0.91)	81.4 (5.3 , 0.98)	77.9 (5.9 , 0.86)	87.7 (8.7 , 0.96)	83.7 (7.6 , 0.90)
Gizzard	89.5 (9.2 , 0.95)	78.8 (6.1 , 0.87)	95.1 (9.0 , 0.93)	80.4 (4.5 , 0.97)	91.6 (6.9 , 0.93)	86.4 (4.9 , 0.92)	90.0 (3.8 , 0.96)
Heart	86.9 (5.9 , 0.92)	89.5 (4.3 , 0.96)	91.4 (5.6 , 0.99)	86.1 (6.0 , 0.96)	80.6 (4.4 , 0.96)	86.8 (6.8 , 0.96)	79.4 (5.6 , 0.84)
Egg	88.8 (3.7 , 0.94)	90.9 (3.7 , 0.99)	85.9 (6.8 , 1.00)	83.6 (3.1 , 0.90)	85.7 (5.7 , 1.00)	85.2 (7.5 , 0.96)	83.3 (4.7 , 0.94)

Samples were spiked with 0.01 mg/kg of each antiviral agent (each compound), n=5.

※1 Mean of five replicates

※2 The matrix effect is expressed as a ratio of the peak area of the matrix standard to the peak area of the standard (0.001 mg/L) in the solvent.

Table 4. Recovery of antiviral agents from chicken products and boiled eggs

Sample	Recovery(%) ^{※1} (Repeatability(%) , Matrix effect ^{※2})						
	Amantadine	Rimantadine	Arbidol	Laninamivir	Oseltamivir	Peramivir	Zanamivir
Yakitori(sauce)	82.8 (7.7 , 0.85)	78.0 (9.0 , 0.78)	99.2 (4.9 , 1.00)	88.9 (4.3 , 0.88)	89.1 (8.8 , 0.86)	89.5 (7.6 , 0.88)	72.6 (4.8 , 0.81)
Yakitori(salt)	90.3 (9.7 , 0.93)	97.8 (8.3 , 1.05)	98.5 (3.1 , 0.98)	88.5 (5.1 , 0.90)	92.4 (7.0 , 0.94)	79.1 (9.4 , 0.83)	86.3 (8.9 , 0.94)
Fried chicken	79.5 (7.3 , 0.80)	80.5 (5.1 , 0.78)	84.2 (9.7 , 0.83)	84.0 (8.3 , 0.91)	86.3 (9.5 , 0.96)	78.8 (9.1 , 0.92)	76.1 (7.6 , 0.84)
Steamed chicken	90.4 (8.9 , 0.91)	82.9 (7.0 , 0.89)	91.5 (8.4 , 0.92)	90.5 (5.0 , 0.95)	90.4 (6.1 , 0.92)	93.5 (8.1 , 0.91)	88.4 (6.2 , 0.93)
Chicken cutlet	92.5 (8.9 , 0.85)	88.5 (10.8 , 1.02)	96.7 (4.4 , 0.98)	85.3 (3.0 , 0.91)	74.0 (4.8 , 0.82)	87.7 (7.4 , 0.92)	92.1 (3.2 , 0.89)
Chicken steak	93.2 (7.9 , 0.94)	91.0 (5.3 , 1.00)	91.5 (3.8 , 1.01)	87.0 (7.0 , 0.95)	90.2 (8.2 , 0.99)	91.0 (4.1 , 0.95)	98.6 (8.1 , 0.96)
Roasted duck	91.3 (3.8 , 0.88)	95.4 (6.9 , 1.04)	97.1 (5.8 , 0.97)	82.3 (7.0 , 0.86)	88.5 (9.3 , 0.96)	97.0 (7.2 , 0.99)	93.6 (5.0 , 0.92)
Chicken soboro	87.2 (8.7 , 0.94)	88.1 (7.5 , 0.96)	89.6 (8.2 , 1.00)	82.2 (7.3 , 0.88)	76.6 (11.2 , 0.90)	82.4 (5.6 , 0.91)	87.5 (8.0 , 0.91)
Boiled egg	80.6 (6.0 , 0.90)	75.0 (7.8 , 0.88)	85.8 (9.2 , 0.91)	78.8 (4.2 , 0.86)	73.3 (5.8 , 0.84)	78.4 (3.1 , 0.90)	75.3 (4.7 , 0.88)

Samples were spiked with 0.01 mg/kg of each antiviral agent (each compound), n=5.

※1 Mean of five replicates

※2 The matrix effect is expressed as a ratio of the peak area of the matrix standard to the peak area of the standard (0.001 mg/L) in the solvent.

① Arbidol

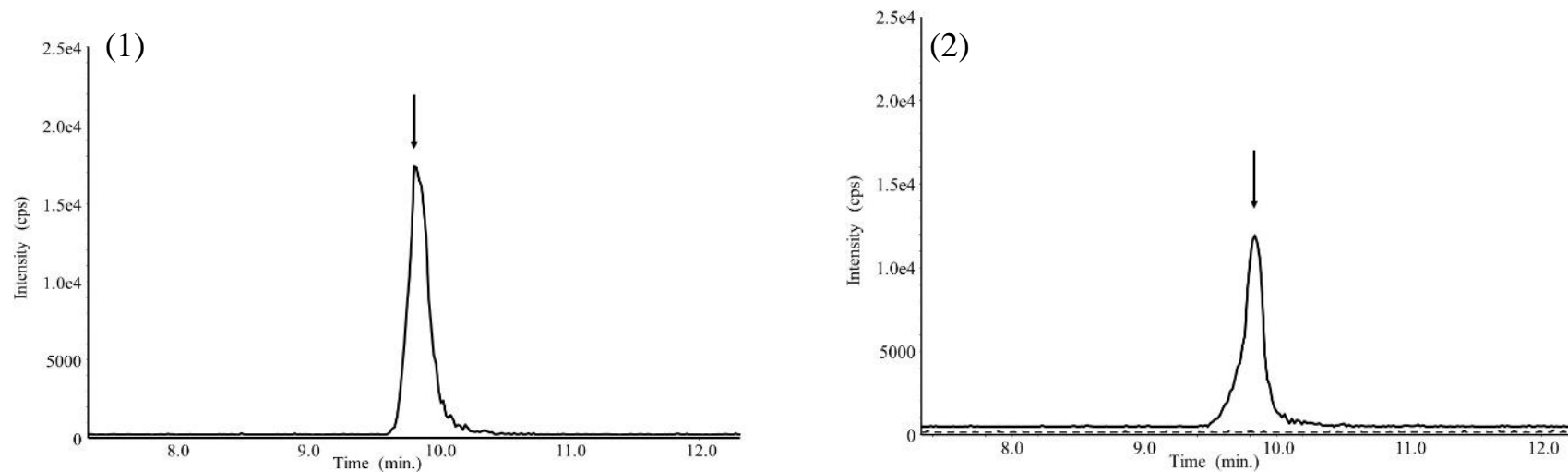


Fig. 8—①. SRM chromatograms of each antiviral agent

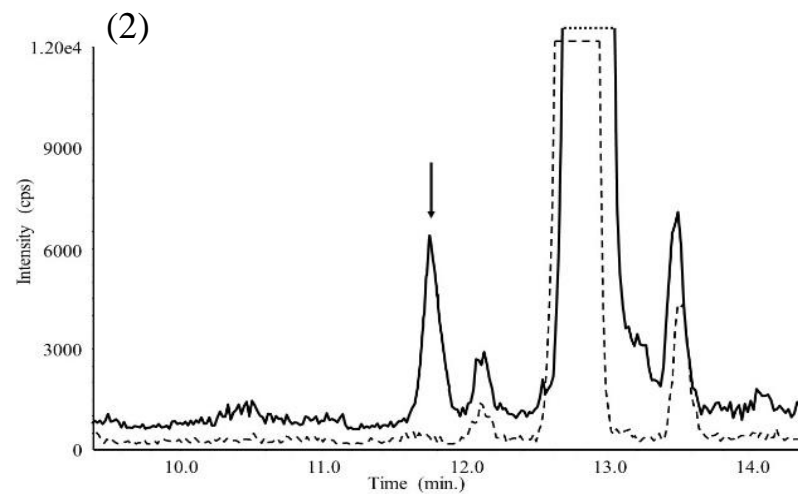
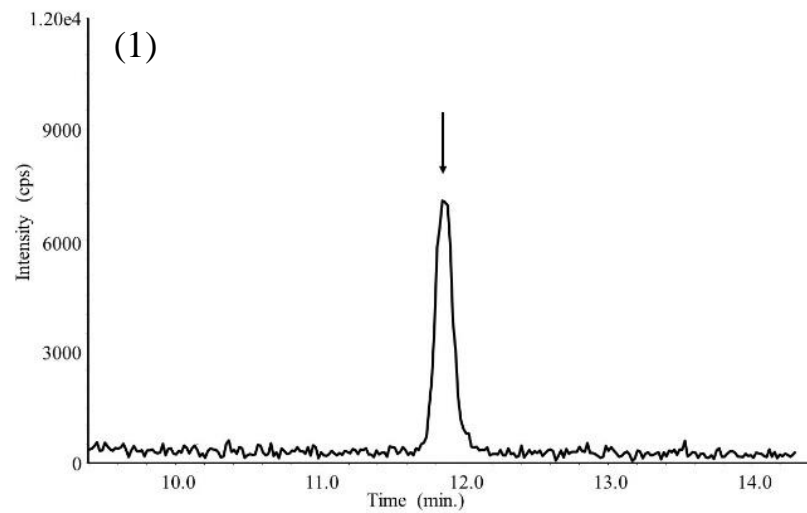
(1) each antiviral agent standard solution (0.001 mg/L)

(2) (- -) : test solution prepared from a chicken muscle sample,

(—): test solution prepared from a chicken muscle sample spiked with antiviral agents
at a concentration of 0.01 mg/kg.

① Arbidol, ② Rimantadine, ③ Oseltamivir, ④ Amantadine, ⑤ Peramivir, ⑥ Laninamivir, ⑦ Zanamivir

②Rimantadine



③Osetamivir

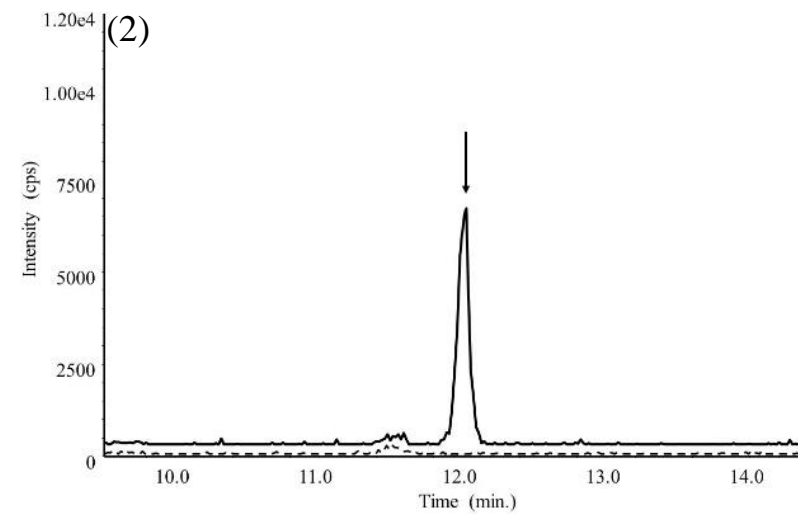
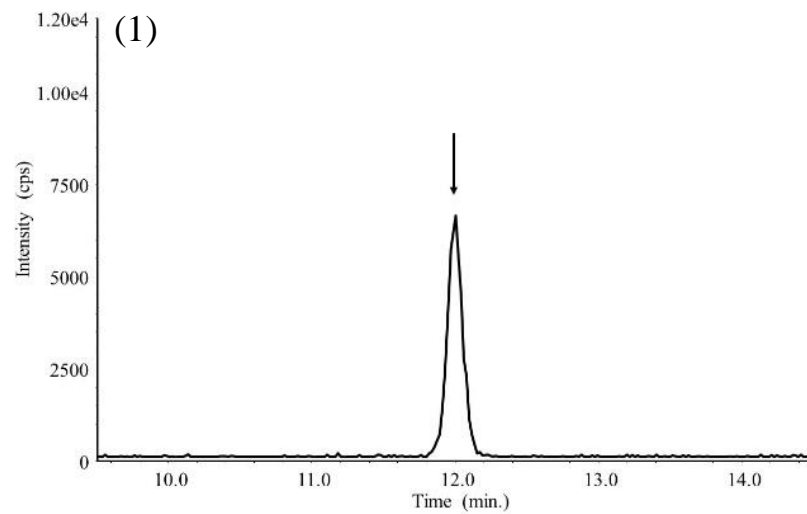
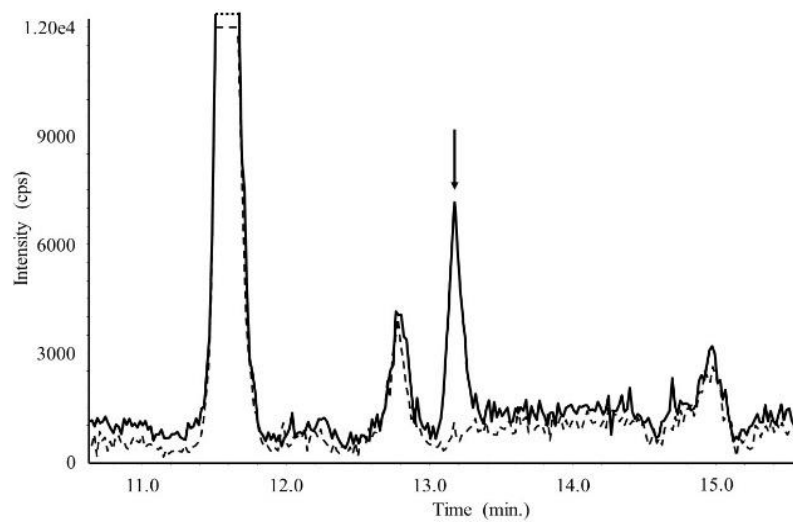
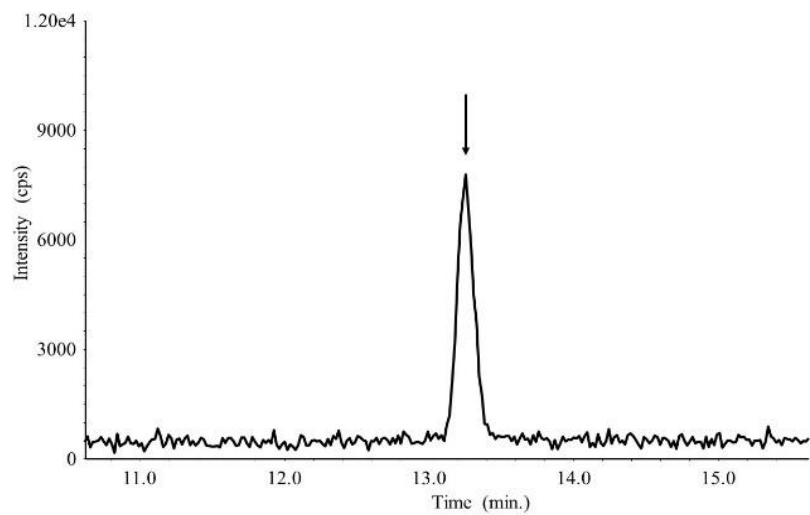


Fig. 8—②. SRM chromatograms of each antiviral agent

④ Amantadine



⑤ Peramivir

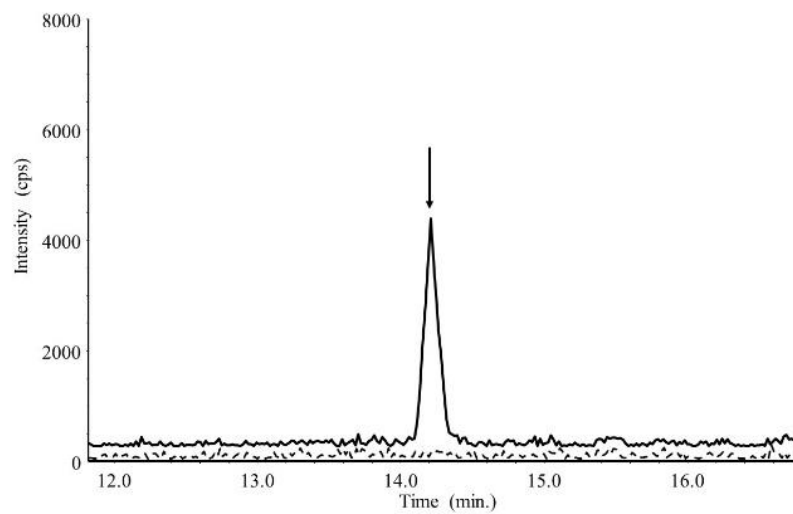
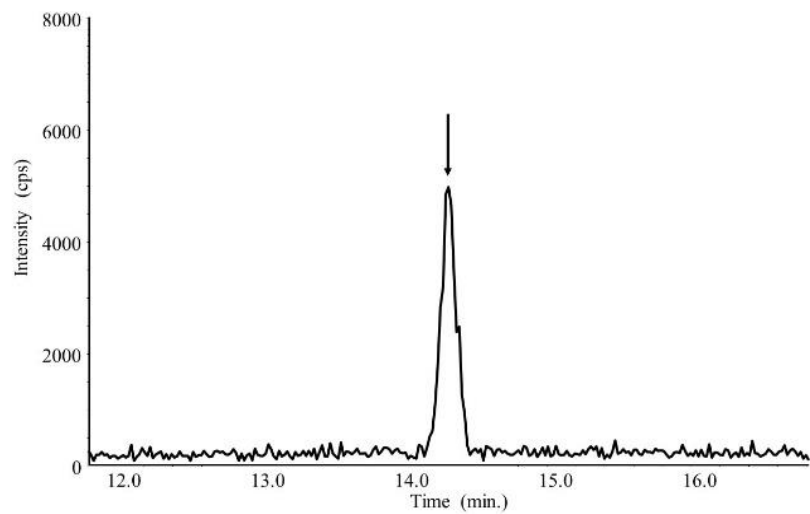
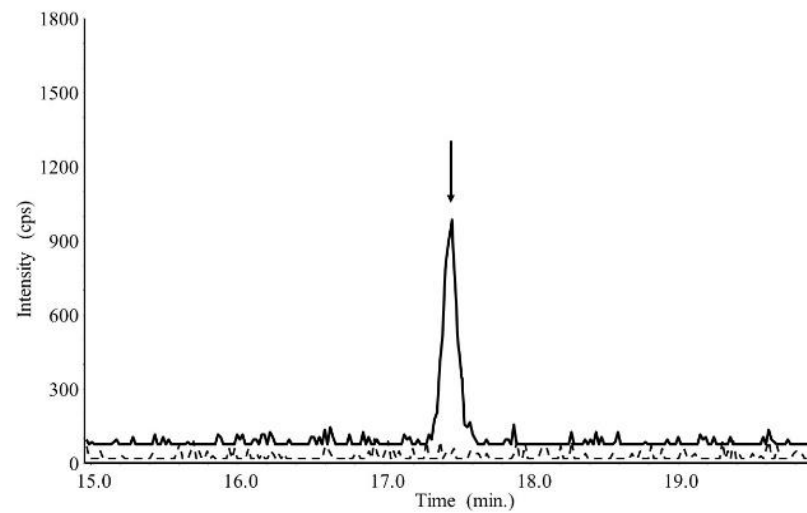
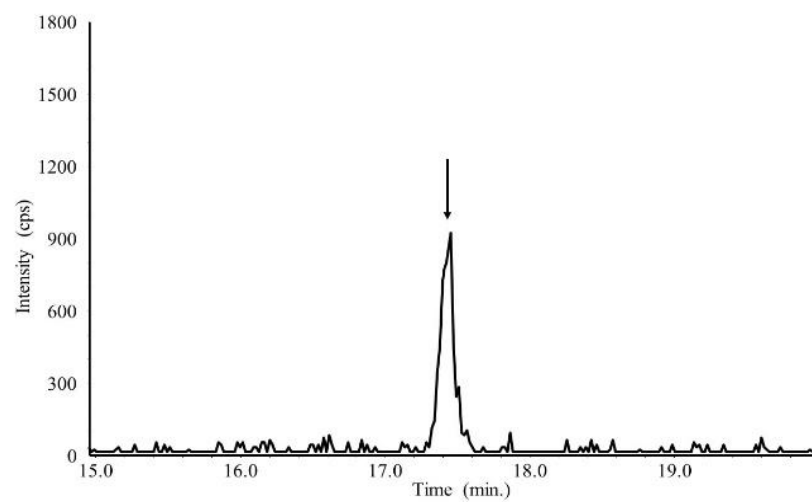


Fig. 8—③. SRM chromatograms of each antiviral agent

⑥Laninamivir



⑦Zanamivir

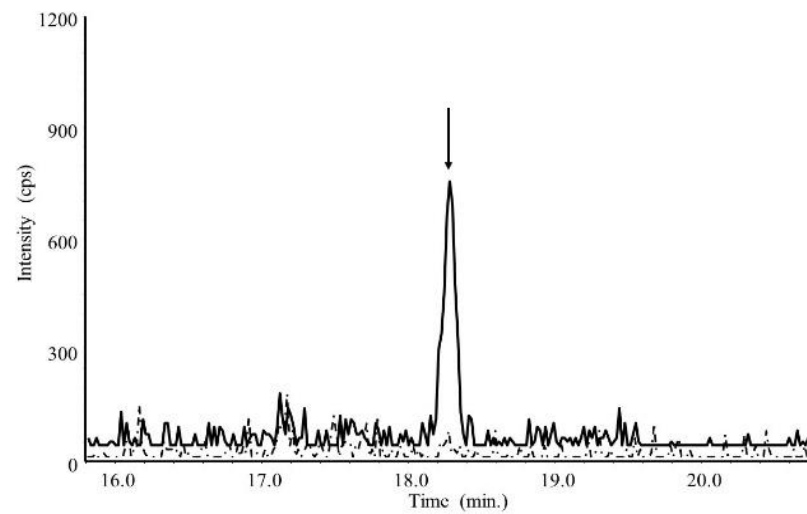
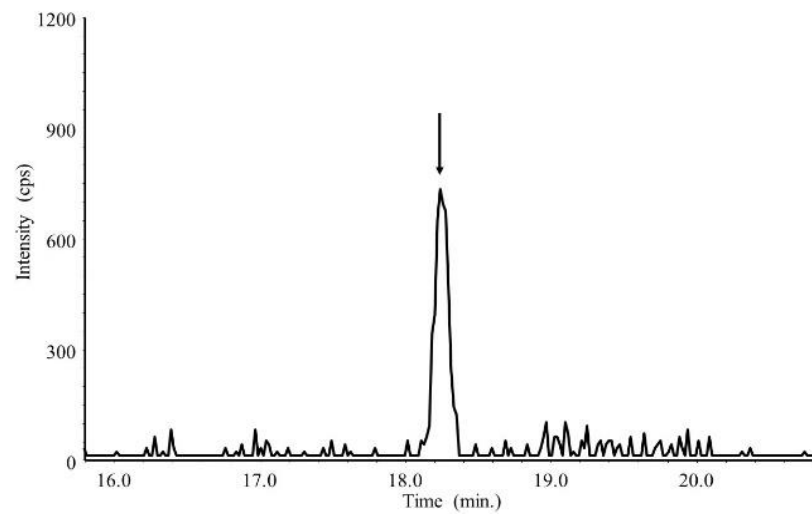


Fig. 8—④. SRM chromatograms of each antiviral agent

本試験法における定量下限値(LOQ)は、各抗ウイルス剤 0.01 mg/kg を添加した試料のクロマトグラムの S/N 比が 10~830 の範囲であった。S/N 比が 10 を満たしたことから、本試験法における定量下限値は、0.01 mg/kg と設定した。

また、アマンタジンおよびリマンタジンの保持時間付近にピークが観察されたが、選択性に影響はないと判断した。

なお、試料マトリックスの影響を確認するため、0.001 mg/L (試料中 ; 0.01 mg/kg 相当)の各マトリックス添加標準溶液と溶媒標準溶液とのピーク面積の比を求めたところ、0.84~1.04 であった。肝臓、心臓などの内臓の肉でオセルタミビルやザナミビルでマトリックスの影響が大きくなる傾向があった。しかし、今回対象としたすべての抗ウイルス剤は、重水素や C13 などの安定同位体でラベル化された内部標準試薬の入手が可能であることから、内部標準を用いた検量線を使用することもできる。また、機器の感度が十分にある化合物については、さらに希釈を行うことでマトリックスの影響を小さくすることができると考えられた。

3. 4. 実態調査

市販されている鶏肉（筋肉、脂肪、肝臓、心臓および砂肝）の 10 試料、鶏卵の 2 試料。それらの加工品である焼き鳥（たれ、塩）6 試料、唐揚げ、サラダチキン、鶏の燻製、チキンカツそれぞれ 4 試料、チキンステーキ 3 試料、ゆで卵、肉だんごそれぞれ 2 試料、鶏そぼろ 1 試料の加工品で 30 試料、合計 42 試料について、開発した試験法を用いて 7 種の抗ウイルス剤の分析を行った。その結果、いずれの抗ウイルス剤も検出されなかった。なお、実態調査に用いた試料は、添加回収試験を実施して S/N=3 以上で抗ウイルス剤が検出されることを確認した。

4. 小括

本研究では、鳥インフルエンザの予防薬として使用実績のあるアマンタジン、使用される可能性があるオセルタミビル、ザナミビル、ペラミビル、ラニナミビル、リマンダジンおよびアルビドールの計 7 種類の抗ウイルス剤を同時に測定する LC-MS/MS 法を開発した。分析法の概要は、試料からメタノール水 (9 : 1) で抽出し、InertSep MAX カートリッジ (上側) 及び InertSep MCX カートリッジ (下側) を連結したミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で測定する方法である。対象とした 7 種類の抗ウイルス剤は、物理的、化学的に性質の異なる化合物であることから、精製工程においてポリマー系の陰

イオン交換体ミニカラムとポリマー系の陽イオン交換体ミニカラムをタンデムに組み合わせることでイオン性の夾雑物だけではなく、ポリマー系の基材が持つ疎水性相互作用の働きによって低極性の夾雑物を合わせて取り除くことができ、精製効率を上げることができた。このタンデムにミニカラムを組み合わせた精製方法は、食品分析の分野での使用例は少なく、物性の異なる物質の精製に大きな効果があることが見いだされた。また、LC-MS/MS測定にはスルフォベタイン基が修飾された ZIC-HILIC カラムを用いることで7種類の抗ウイルス剤を短時間にピーク形状も良好なクロマトグラムを得ることができた。

また、開発した試験法を用いて鶏組織および鶏卵など 6 試料及び焼き鳥、唐揚げ、サラダチキン、チキンステーキ、チキンカツなど 9 種類の加工品に適用した結果、真度、併行精度ともに良好な結果であった。本分析法は、日本での消費量が多い鶏の加工品等にも適用できることが確認された。したがって、中国等から輸入される種々の鶏加工品のモニタリング検査にも活用できると考えられた。

なお、本研究は厚生労働省の厚生労働科学研究として採用されたものであり、将来、公定法への適用が期待できる。

第2章 食品中の農薬・動物用医薬品の分析法に関する研究

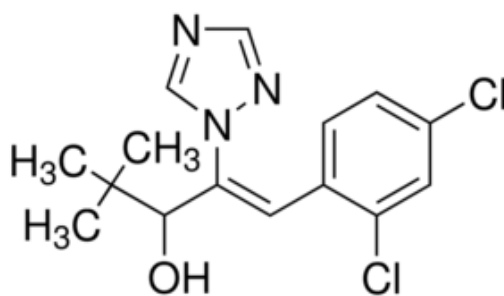
第1節 LC-MS/MSによる農産物および畜水産物中のジニコナゾールの分析法

1. 緒言

ジニコナゾールは、農作物に対するトリアゾール系の殺菌剤である。その作用機序は主として菌類の細胞膜の形成に必要なエルゴステロールの生合成における14 α -脱メチル化を阻害することにより、寄主植物の内部あるいは表面上での菌糸の生長を阻害することによると考えられている。うどん粉病、赤さび病、黒星病など広範囲の疾病を抑制するのに有効な薬剤であるが、わが国では農薬として登録されておらず、残留農薬基準も設定されていないことから、一律基準値(0.01 ppm)が適用される農薬である。ここ数年、検疫所のモニタリング検査や東京都等の調査で韓国産のエゴマ⁷⁹⁾やタイや中国産の未成熟えんどう⁸⁰⁾からジニコナゾールが検出される事例が相次ぎ、残留実態を把握する必要性が高まっている。また、農産物だけでなく、飼料を経由した畜水産物への残留も懸念され、農産物の他、畜産物、水産物にも適用できる試験法の開発が望まれている。

ジニコナゾールの分析法としてはGC^(81), 82)、HPLC⁽⁸³⁾、HPLC-MS^(84), 85)などいくつか報告されているが、農産物に対する分析法が中心であり、畜水産物をも含めた分析法はほとんど見られない。今回、農産物に加え、畜水産物にも幅広く適用できることを目標にしてジニコナゾール分析法の開発を行った。

ジニコナゾールの構造式を図1に示した。



M.W. : 326.23 Log Pow:4.3(25°C)

Fig.1. Structure of diniconazole

2. 実験方法

2. 1. 試料

試料は、神奈川県内のスーパーマーケット、小売店にて市販品を購入し

た。農産物として玄米（秋田県産）、大豆（北海道産）、ほうれんそう（埼玉県産）、キャベツ（群馬県産）、ばれいしょ（北海道産）、オレンジ（輸入）、りんご（青森県産）および茶（静岡県産）の計 8 種、畜水産物として牛の筋肉（国産）、牛の脂肪（国産）、牛の肝臓（国産）、鶏卵（千葉県産）、牛乳（北海道産）、はちみつ（3 種類：アンジェリカ、メリーロート、リンデン）（輸入）、しじみ（国産）および千葉県内の養殖業者から購入したうなぎの計 8 種を用いた。

2. 2. 試薬

ジニコナゾール標準品は Sigma-Aldrich 社製(純度 99.8%)を用いた。標準品は、10 mg を精秤し、アセトニトリルに溶解して 10 mL としたものを標準原液(1000 mg/L)とした。さらに、標準原液をアセトニトリル-水 (1:1、v/v) で 1 mg/L に希釈し、標準溶液とした。また、標準溶液をアセトンで 0.1 mg/L に希釈し、添加回収試験用の標準溶液とした。

固相抽出カラム：InertSep FL-PR(1 g/6 mL)（以下フロリジルミニカラムとする）（GL サイエンス(株)製）、InertSep GC(500 mg/6 mL)（以下グラファイトカーボンミニカラムとする）（GL サイエンス(株)製）フロリジルミニカラムはあらかじめ *n*-ヘキサン 20 mL で、グラファイトカーボンミニカラムはアセトン-*n*-ヘキサン (2:3、v/v) 混液 20 mL でコンディショニングしたものを用いた。

その他の試薬：アセトンは富士フィルム和光純薬(株)製の残留農薬試験用、アセトニトリルおよび *n*-ヘキサンは関東化学(株)製の残留農薬試験用を用いた。ケイソウ土は富士フィルム和光純薬(株)製のハイフロスーパーセルを用いた。LC-MS の移動相には、関東化学(株)製のアセトニトリルおよび富士フィルム和光純薬(株)製のギ酸を用いた。

2. 3. 装置

ホモジナイザーは SMT COMPANY 社製マルチディスパーサー PB-95、遠心分離機は久保田商事(株)製ユニバーサル冷却遠心機 5930、ロータリーエバポレーターは BUCHI 社製有機溶媒回収装置 V-703 を用いた。高速液体クロマトグラフは(株)島津製作所製 LC-20AD、質量分析装置は SCIEX 社製 API-4000 を使用した。

2. 4. 測定条件

LC-MS/MS 操作条件を表 1 に示した。

Table 1. LC-MS/MS operating conditions

Parameter	Setting														
LC Conditions															
LC column	Inertsil ODS-3(2.1 mm i.d.×150 mm,3 μm)														
Mobile phase	A=0.1 vol% formic acid B=0.1 vol% formic acid in acetonitrile														
Linear gradient elution	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time(min)</th> <th>A(%)</th> <th>B(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> </tbody> </table>			Time(min)	A(%)	B(%)	0	90	10	10	10	90	20	10	90
Time(min)	A(%)	B(%)													
0	90	10													
10	10	90													
20	10	90													
Flow rate	0.2 mL/min														
Column temperature	40°C														
Injection volume	10 μL														
Run time	20 min														
MS Conditions															
Ionization mode	ESI(positive mode)														
Ion spray voltage	4,500V														
Curatin gas (N ₂)	10 psi														
Desolvation temperature	400°C														
Collision gas	8 psi														
Ion source gas 1	30 psi														
Ion source gas 2	20 psi														
Transition															
	precursor m/z	product m/z	Cone Voltage(V)	Collision energy(eV)											
	326.2	70.1 ^{a)}	71	71											
	326.2	159.0 ^{b)}	16	49											
	a) Used for a quantitative analysis		b) Used for a qualitative analysis												

2. 5. 検量線の作成

ジニコナゾール標準原液をアセトニトリル-水(1:1、v/v)混液で希釈し、0.00125~0.0075 mg/L(n=6)の濃度範囲の検量線用標準溶液を調製し、それぞれをLC-MS/MSに注入した。得られたクロマトグラムからジニコナゾールのピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。

2. 6. 試験溶液の調製

2. 6. 1. 抽出

(1) 農産物

野菜(ほうれんそう、キャベツおよびばれいしょ)および果実(オレンジ、りんご)の場合は、試料20gを量り採りアセトン100mLを加えてホモジナ

イズしたのち、ケイソウ土を敷いたろ紙（直径 60 mm、No.5A、（有）桐山製作所製）を用いて吸引ろ過した。残渣にアセトン 50 mL を加えて同様に操作し、得られたろ液を合わせて 40°C 以下で約 15 mL まで濃縮した。これに 10% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え、*n*-ヘキサン 100 mL および 50 mL で 2 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、これに無水硫酸ナトリウムを加えて脱水したのち、ろ過し、40°C 以下で溶媒を留去した。残留物に *n*-ヘキサン 10 mL を加えて溶解し、試料溶液とした。

茶の場合は試料 5 g を量り採り、水 20 mL を加えて 30 分間放置し湿潤させたのち、野菜および果実の場合と同様の操作を行い、試料溶液を作製した。

玄米および大豆の場合は、試料 10 g を量り採り、水 20 mL を加えて 30 分間放置し湿潤させたのち、野菜および果実の場合と同様の操作を実施したのち、脱水した溶媒を留去し、残留物に *n*-ヘキサン 30 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで 3 回振とう抽出した。アセトニトリル層を合わせ、40°C 以下で溶媒を留去したのち、残留物に *n*-ヘキサン 10 mL を加えて溶解し、試料溶液とした。

（2）畜水産物

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、しじみ、うなぎおよびはちみつの場合は、試料 20 g を量り採り、水 20 mL を加えてホモジナイズしたのち、これにアセトン-*n*-ヘキサン（1：2）混液 100 mL を加え、さらにホモジナイズした。毎分 2,500 回転（1,310×*g*）で 5 分間遠心分離し、上層のアセトン-*n*-ヘキサン層を分取した。次いで下層のアセトン-水層および残渣に *n*-ヘキサン 50 mL を加え同様に操作した。得られた有機層を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水したのち、ろ過し、40°C 以下で溶媒を留去した。はちみつ以外の試料については以下の操作を実施した。残留物にヘキサン 30 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで 3 回振とう抽出した。アセトニトリル層を合わせ、40°C 以下で溶媒を留去した。得られた残留物に *n*-ヘキサン 10 mL を加えて溶解し、試料溶液とした。

牛乳および鶏卵の場合は、試料 20 g を量り採り、アセトン-*n*-ヘキサン（1：2）混液 100 mL を加え、ホモジナイズした。以下筋肉等と同様に操作し、試料溶液とした。

2. 6. 2. 精製

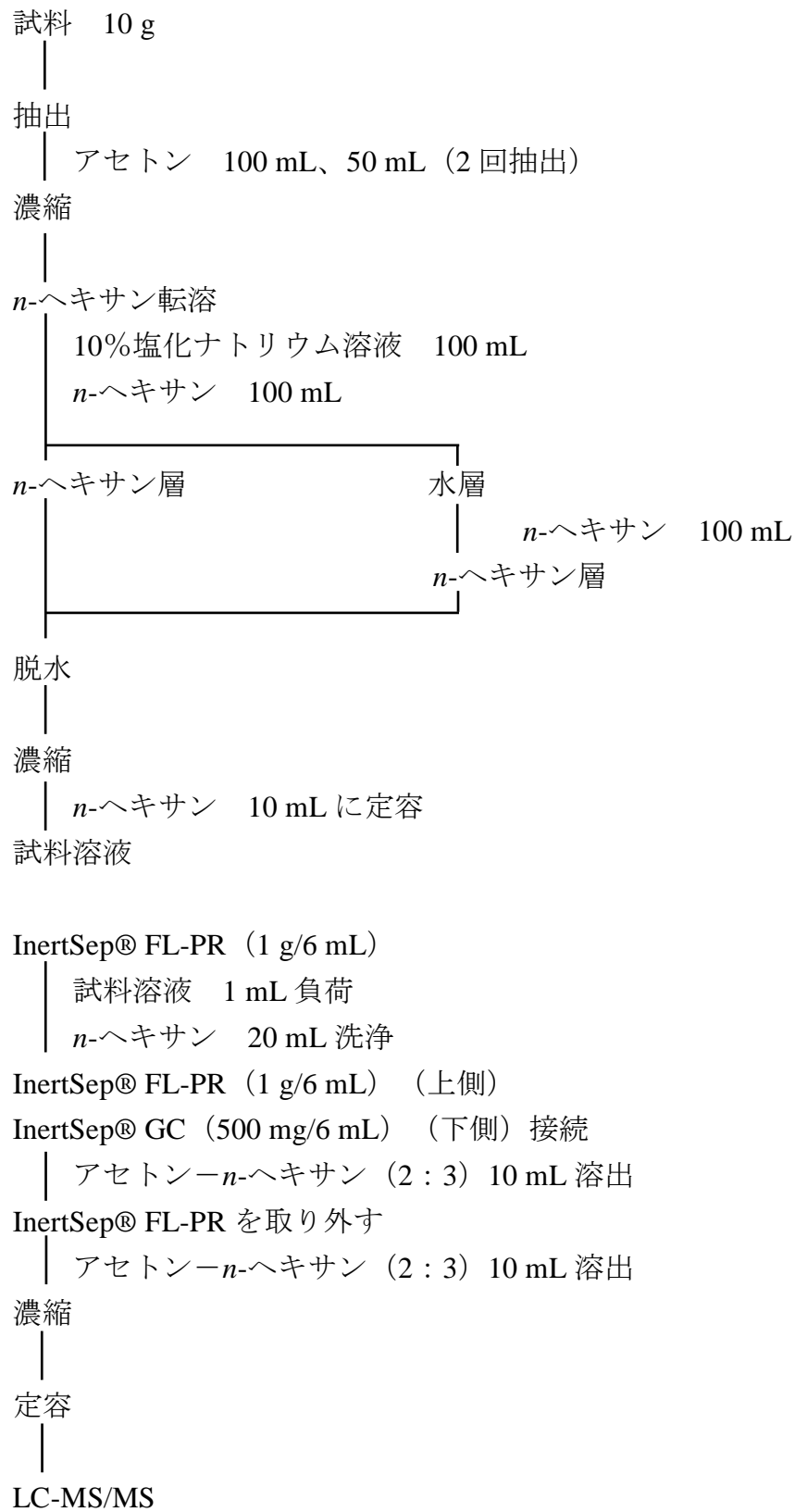
農産物および畜水産物で得られた試料溶液 1 mL を *n*-ヘキサン 20 mL でコンディショニングしたフロリジルミニカラムに負荷し、次いでカラムを *n*-ヘキサン 20 mL で洗浄したのち、アセトン-*n*-ヘキサン（2：3）混液 10 mL で

ジニコナゾールを溶出した。得られた溶出液の溶媒を 40℃以下で留去した。残留物にアセトニトリル-水 (1 : 1) 混液 4 mL (玄米および大豆の場合は 2 mL、茶および脂肪の場合は 1 mL) を加え溶解したものを試験溶液とした。

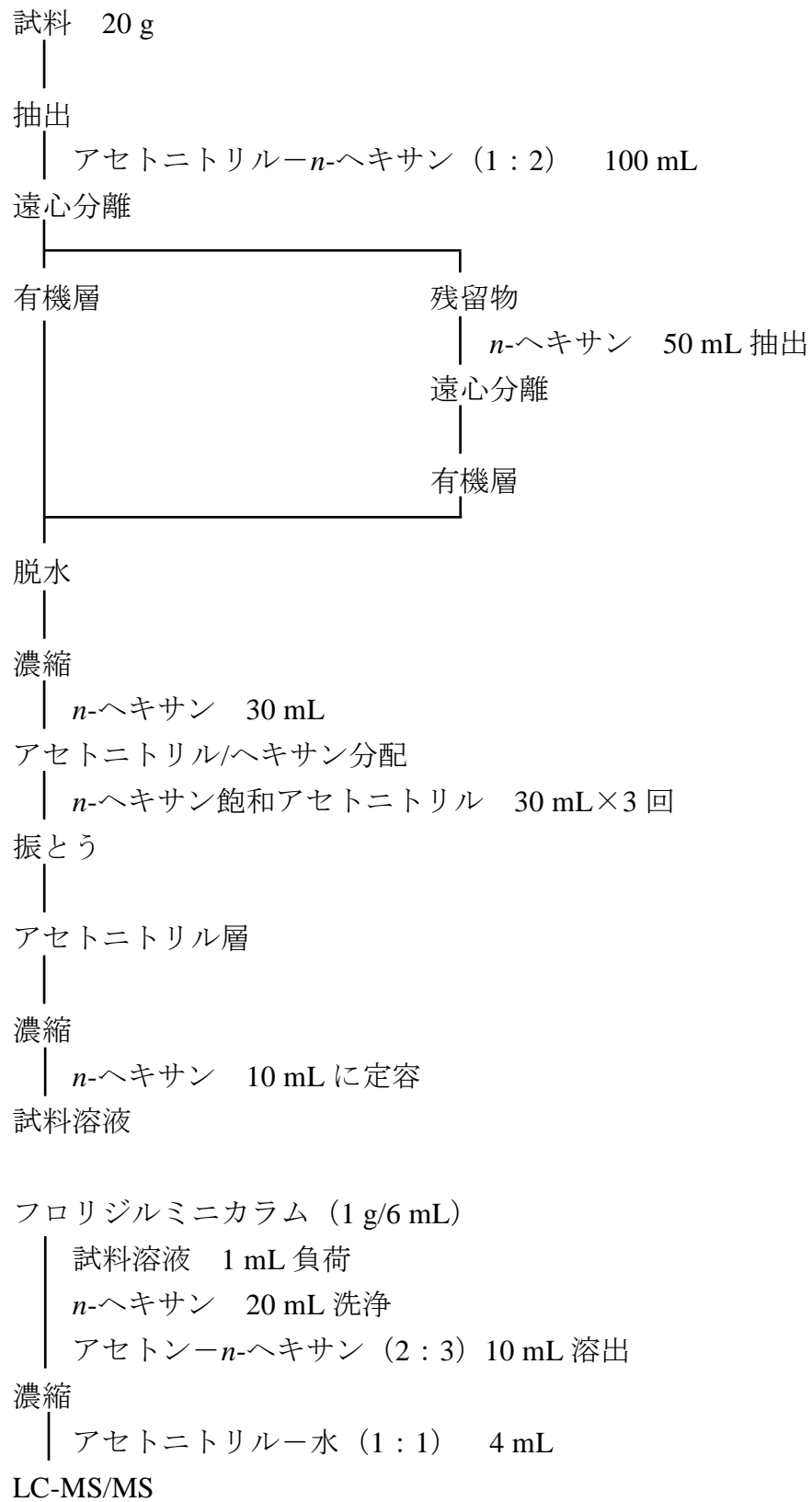
葉緑素やその他の妨害物質の影響でさらに精製が必要なほうれんそうや茶の場合は、フロリジルミニカラムでの洗浄後、このカラムの下にグラファイトカーボンミニカラムを接続し、この連結カラムにアセト-*n*-ヘキサン (2 : 3) 混液 10 mL を注入し、溶出液を採取した。次いで、フロリジルミニカラムを取り外し、グラファイトカーボンミニカラムにアセト-*n*-ヘキサン (2 : 3) 混液 10 mL を注入し、溶出液を先の溶出液と合わせた。この溶出液の溶媒を 40℃以下で留去し、得られた残留物にアセトニトリル-水 (1 : 1) 混液 4 mL (玄米および大豆の場合は 2 mL、茶の場合は 1 mL) を加えて溶解したものを試験溶液とした。農産物 (野菜・果実) の分析操作を Schem 1、畜水産物 (牛筋肉) の分析操作を Schem 2 に示す。

2. 7. 定量

得られた試験溶液を表 1 に示した LC-MS/MS の操作条件により、測定を行い、得られたピーク面積から絶対検量線によりジニコナゾールの定量を行った。



Schem 1. Analytical procedures for diniconazole in vegetables and fruits



Schem 2. Analytical procedures for diniconazole in bovine muscle

3. 結果および考察

3. 1. 測定条件の検討

3. 1. 1. MS 条件の検討

ジニコナゾールを LC-MS/MS で測定するための MS 条件の検討を行った。まず、イオン化モードについてはエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を用いることとし、測定モードを選択するために、直接注入測定を行った。その結果、プロトン付加分子である m/z 326.2 $[M+H]^+$ が強く検出されたためポジティブモードを採用した。次にジニコナゾールのプロトン付加分子である m/z 326.2 $[M+H]^+$ をプリカーサーイオンとして、Selected Reaction Monitoring (SRM、選択反応性モニタリング) モードでの測定条件を検討した結果、表 1 に示した通り、衝突誘起解離によって得られたトリアゾールと考えられる m/z 326.2 \rightarrow 70.1 を定量イオンに、ジクロロフェニルメチレンと考えられる m/z 326.2 \rightarrow 159.0 を定性イオンとすることにした。また、それぞれのマスクロマトグラムを図 2 に示した。

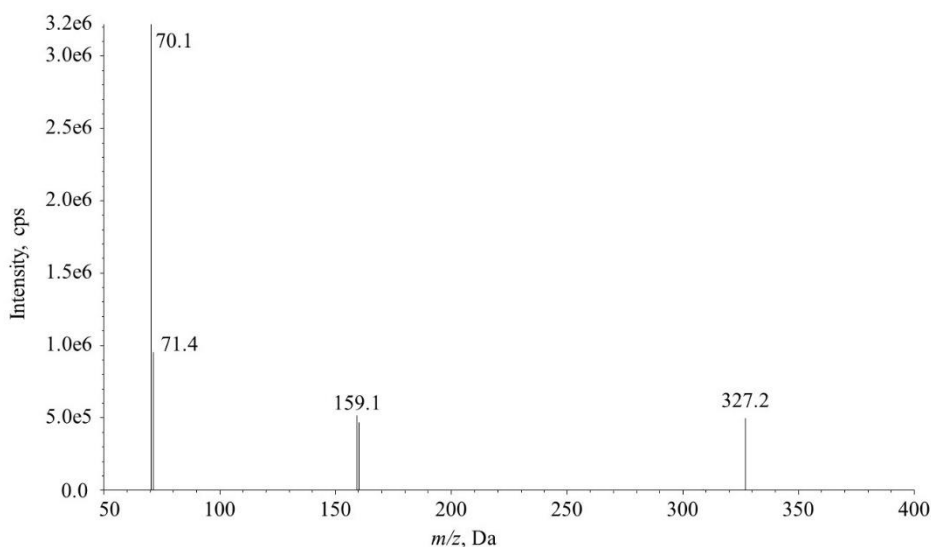


Fig. 2. Mass spectrum of diniconazole

3. 1. 2. LC 条件の検討

次に LC の分析条件について検討した。カラムには汎用性の高い逆相分配系の ODS カラムを用いることとし、数種のカラムについて表 1 に示した操作条件に従い、ジニコナゾールのピーク形状や感度について検討したが、ピーク形状や保持時間の変動、MS 感度等に大きな違いはなく、最終的には Inertsil ODS-3 カラム (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m、ジーエルサ

イエンス(株製)を用いることとした。

移動相については、イオン化を促進するための添加剤としてギ酸および酢酸のそれぞれ3濃度(0.05、0.1および0.2 vol%)、有機溶媒としてアセトニトリルおよびメタノールとの組み合わせについて検討した結果、アセトニトリル—0.1 vol%ギ酸を移動相として用いた時に最も良好な感度が得られた。

3. 2. 試験溶液の調製

3. 2. 1. 抽出法

農産物中からのジニコナゾールの抽出溶媒としては、ジニコナゾールの溶解性が高く(95 g/kg)、また、幅広い極性の化合物を抽出することが可能であり、残留農薬の抽出溶媒として多くの個別分析法に採用されているアセトンを用いたところ、ジニコナゾールは問題なく回収された。一方、目的成分の抽出効率が良いと同時に、多くの夾雑成分も同時に抽出されるため、比較的高極性の夾雑成分を削減するために、ジニコナゾールを低極性溶媒の*n*-ヘキサンへの転溶と穀類や豆類に由来する脂質などの比較的低極性の夾雑成分を除去するため各種ミニカラムを用いた精製を検討した。

まず、アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配による妨害成分の除去操作を検討した。10%塩化ナトリウム溶液100 mLにアセトンで調製した1 mg/Lのジニコナゾール標準溶液を1 mL添加し、*n*-ヘキサン100 mLで1回、50 mLで2回、計3回振とう抽出を行い、抽出率を調べた。その結果、100 mLで1回、50 mLで1回の計2回の操作でほぼ全量回収することができたことから、本操作でも*n*-ヘキサン100 mLおよび50 mLの計2回で行うこととした。

畜水産物からの抽出溶媒としては、農産物と同じアセトンを用いたところ、試料によっては濃縮操作時に突沸を起こすことがあったが、アセトン—*n*-ヘキサン混液では突沸現象を回避することができた。そこで、通知一斉分析法「GC/MSによる農薬等の一斉試験法(畜水産物)」でも採用されているアセトン—*n*-ヘキサン(1:2)混液を用いたところ、問題なくジニコナゾールを抽出することができた。この場合でも、抽出溶媒を留去すると脂質成分が残留し、その後の操作で妨害となるため、アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配による脂質成分の除去操作を検討した。*n*-ヘキサン30 mLにアセトンで調製した1 mg/Lのジニコナゾール標準溶液を1 mL添加し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで抽出操作を繰り返したところ、3回でほぼ全量ジニコナゾールを回収することができた。そこで、畜水産物については*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルによる脱脂操作を追加することとした。また、同様に農産物の玄米や大豆においても、抽出溶媒中に脂質成分が抽出されてくるため、アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配による脱脂操作を追加することとした。

3. 2. 2. 固相抽出ミニカラムによる精製

分析対象食品は農産物から畜水産物までと幅広いため、抽出溶媒に溶解性の高いアセトンを用いており、アセトン抽出液から *n*-ヘキサンへの転溶、さらに、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルへの転溶操作を経ても測定妨害となる夾雑物の残留が多いものがあり、さらなる精製操作が必要であった。

そこで、このような比較的極性の低い夾雑物の除去を目的にシリカゲル、フロリジル、アミノプロピルなど種々の順相系固相抽出ミニカラムについて検討したところ、フロリジルでの除去効果が最も大きかったため、フロリジルミニカラムでの精製条件を検討した。溶出溶媒として *n*-ヘキサン、アセトン-*n*-ヘキサン (1:19) 混液、アセトン-*n*-ヘキサン (1:9) 混液、アセトン-*n*-ヘキサン (3:7) 混液およびアセトン-*n*-ヘキサン (2:3) 混液の 5 種類を用い、*n*-ヘキサンでコンディショニングしたフロリジルミニカラムに 5 種類の溶出溶媒で調製した 0.25 mg/L のジニコナゾール標準溶液 2 mL をそれぞれ添加した。5 種類の溶出溶媒を各々 5 mL ずつ計 50 mL 負荷し、各々の溶出画分中のジニコナゾールを測定した。その結果を表 2 に示す。*n*-ヘキサン画分からはジニコナゾールは全く検出されなかったが、アセトン-*n*-ヘキサン (3:7) 画分では 20 mL、アセトン-*n*-ヘキサン (2:3) 画分では 10 mL でほぼ全量のジニコナゾールが溶出した。一方、アセトン-*n*-ヘキサン (1:19) 画分およびアセトン-*n*-ヘキサン (1:9) 画分では、50 mL 溶出しても全量を回収することができなかった。この結果から、*n*-ヘキサン 20 mL でカラムの洗浄を行い、溶出はアセトン-*n*-ヘキサン (2:3) 混液 10 mL で行うこととした。次いで実試料を用いて精製効果を確認したところ、ほうれんそうおよび茶を除く 14 種の試料で 92.5~107% の回収率を得ることができ、SRM クロマトグラムにも測定を妨害するピークは確認されなかった。

一方、ほうれんそうおよび茶では溶出液に色素や不溶物が残り、試験溶液の懸濁が認められ、分析カラムや測定装置への影響が懸念された。そこで、色素成分の除去効果が期待できるグラファイトカーボンミニカラムを用いた追加精製の検討を行った。その結果を表 3 に示す。アセトン-*n*-ヘキサン (2:3) 混液でコンディショニングした同カラムに *n*-ヘキサンで調製した 0.25 mg/L のジニコナゾール標準溶液 2 mL を添加し、次いで溶出溶媒としてアセトン-*n*-ヘキサン (3:7) 混液およびアセトン-*n*-ヘキサン (2:3) 混液の 2 種類を溶出溶媒として用い、各々 5 mL ずつ計 50 mL 負荷し、各々の溶出画分中のジニコナゾールを測定した。その結果、アセトン-*n*-ヘキサン (3:7) 混液では溶出に 50 mL を要したが、アセトン-*n*-ヘキサン (2:3) 混液では 10 mL でほぼ全量が溶出された。

次に、操作性を考え、フロリジルミニカラムおよびグラファイトカーボンミニカラムを連結した際の溶出挙動を検討した。その結果を表4に示す。

フロリジルミニカラムおよびグラファイトカーボンミニカラムのそれぞれをアセトン-*n*-ヘキサン (2:3) 混液 20 mL でコンディショニングしたのち、フロリジルミニカラムの下にグラファイトカーボンミニカラムを接続して *n*-ヘキサンで調製した 0.25 mg/L のジニコナゾール標準溶液 2 mL を負荷した。先の検討でジニコナゾールはフロリジルミニカラムからは、アセトン-*n*-ヘキサン (2:3) 混液 10 mL で全量溶出することが確認されていることから、同溶媒を 10 mL 負荷したのち、フロリジルミニカラムを取り外し、グラファイトカーボンミニカラムにアセトン-*n*-ヘキサン (2:3) 混液を 5 mL ずつ 20 mL 負荷して、それぞれの溶出画分を測定した。その結果、フロリジルミニカラムを取り外したのち、さらにアセトン-*n*-ヘキサン (2:3) 混液 10 mL で溶出することでほぼ全量のジニコナゾールを回収することができた。

ほうれんそうおよび茶の実試料を用いて確認したところ、懸濁のない透明な試験溶液となり、良好な結果を得ることができた。ほうれんそうの抽出液をフロリジルミニカラムおよびグラファイトカーボンミニカラムを用いて精製した時の試験溶液の色を写真に示す。

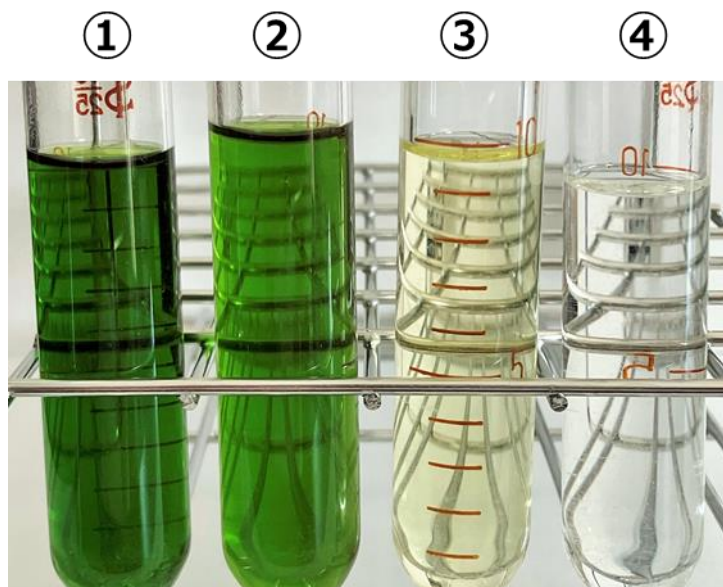


Photo. Color of extraction solution by difference of purification method

Columns used

- ① Extraction Solution, ② InertSep® FL cartridge,
- ③ InertSep® GC cartridge,
- ④ InertSep® FL cartridge, InertSep® GC cartridge

Table 2. Recovery of diniconazole from each fraction of different solvents used for elution from the InertSep® FL cartridge

amount(mL)	elution solvent	Recovery (%)				
		<i>n</i> -hexane	Acetone/ <i>n</i> -hexane(3:7)	Acetone/ <i>n</i> -hexane(2:3)	Acetone/ <i>n</i> -hexane(1:9)	Acetone/ <i>n</i> -hexane(1:19)
Load		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0~5		0.0	22.2	103.3	0.3	0.0
5~10		0.0	71.1	0.0	2.4	0.2
10~15		0.0	9.1	0.0	6.5	1.4
15~20		0.0	1.0	0.0	9.8	3.1
20~25		0.0	0.0	0.0	12.7	5.3
25~30		0.0	0.0	0.0	13.2	7.5
30~35		0.0	0.0	0.0	11.8	8.9
35~40		0.0	0.0	0.0	11.1	9.4
40~45		0.0	0.0	0.0	8.5	9.1
45~50		0.0	0.0	0.0	6.9	8.6
total		0.0	103.4	103.3	83.2	53.5

Two milliliters of standard solution (0.25 mg/L in prepared in each elution solvent) was loaded onto the InertSep® FL cartridge. It was then eluted with solvents at various ratios of in each elution solvent. Five milliliters of each fraction was collected and the recovery of diniconazole was assessed.

Table 3. Recovery of diniconazole from each fraction of different solvents used for elution from the InertSep® GC cartridge

amount(mL)	elution solvent	Recovery (%)	
		Acetone/ <i>n</i> -hexane(3:7)	Acetone/ <i>n</i> -hexane(2:3)
	Load	0.0	0.0
	0~5	0.0	78.2
	5~10	0.3	39.1
	10~15	3.1	1.2
	15~20	11.7	0.0
	20~25	27.3	0.0
	25~30	27.6	0.0
	30~40	26.2	0.0
	40~45	5.3	0.0
	total	101.5	118.5

Table 4. Recovery of diniconazole when an InertSep® FL cartridge was connected to an InertSep® GC cartridge

amount(mL) solvent	elution	Recovery(%)	
		FL-GC ^{※1}	GC ^{※2}
	Load	0.0	—
Fr.1	0~5	2.3	—
Fr.2	5~10	88.9	—
Fr.3	10~15	0.0 ^{※3}	12.7
Fr.4	15~20	0.0	2.0
	total	91.2	14.7 (105.9 ^{※4})

Two milliliters of standard solution (0.25 mg/L in hexane) was loaded onto the connected InertSep® FL cartridge and InertSep® GC cartridge. Five ml of each fraction was collected when eluted with acetone-hexane (2:3) to evaluate the recovery of diniconazole.

※1 The InertSep® FL cartridge was connected to an InertSep® GC cartridge and eluted with acetone-hexane (2:3). (Fr.1-2)

※2 After removal of the InertSep® FL cartridge, the fractions were eluted from the InertSep® GC cartridge with acetone-hexane (2:3). (Fr.3-4)

※3 The removed InertSep® FL cartridge was eluted with additional acetone-hexane (2:3). (Fr.3-4)

※4 Elution from InertSep® GC Cartridge (total elution)

3. 3. 添加回収実験

農産物として玄米、大豆、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、りんごおよび茶の 8 種、畜水産物として牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛の腎臓、鶏卵、はちみつ、うなぎおよびしじみの 8 種、計 16 種の試料に一律基準値(0.01 ppm)に相当するジニコナゾールを添加し、30 分間室温で放置したのち、抽出操作を行った。その結果を表 5 に示した。農産物 8 試料における真度 (n=5) は 88.3~103%、併行精度は 0.5~5.1%、畜水産物 8 試料における真度は 102~108%、併行精度は 2.0~4.9%の範囲内であった。また、試料マトリックスの影響を確認するため、添加回収濃度レベルにおけるマトリックスを添加した標準溶液と溶媒標準溶液とのピーク面積の比を求めたところ、農産物で 0.87~1.03、畜水産物で 0.96~1.03 であったことから、本分析法における試料マトリックスの測定への影響は少ないものと考えられた。図 3-①、②に茶とうなぎの代表的な SRM クロマトグラムを示した。検討したすべての試料において分析の支障となるピークは認められなかった。本法における定量下限は 0.01 mg/kg であった。

Table 5. Recoveries of diniconazole from agricultural products, livestock and marine products

Sample	Recovery ^{※1} (%)	RSD ^{※2} (%)	Matrix effect ^{※3} (%)
Brown rice	101	1.1	0.89
Soybean	88.3	3.1	0.95
Potato	91.1	3.5	1.01
Spinach	99.5	1.0	0.98
Cabbage	103	4.1	1.03
Orange	93.2	4.9	0.99
Apple	95.6	0.5	0.99
Green tea	103	5.1	0.87
Bovine muscle	108	4.2	1.03
Bovine fat	104	3.9	0.99
Bovine liver	103	3.5	1.00
Fresh water clam	102	4.3	0.99
Eel	102	4.9	0.96
Milk	104	3.8	1.02
Egg	108	3.3	1.03
Honney	106	2.0	1.00

※1 added:0.01 mg/kg, n=5

※2 Restorative standard deviation

※3 Matrix effect was expressed as the ratio of the mean peak area of matrix standard to the mean peak area of solvent standard multiplied by 100.

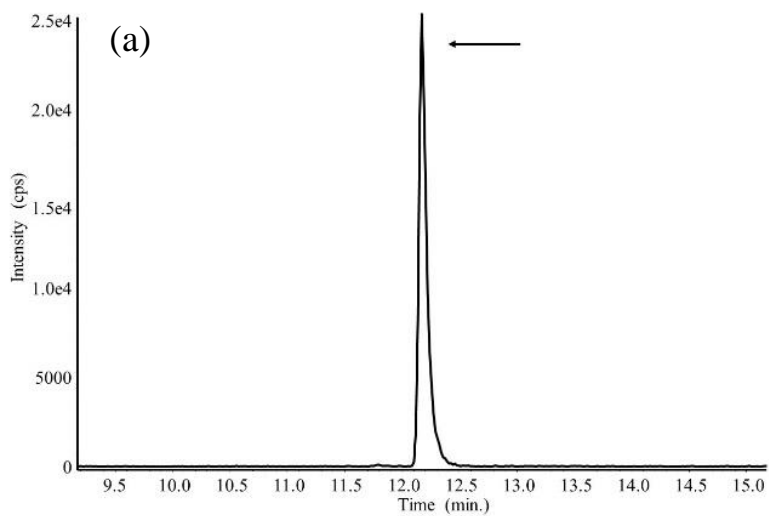


Fig.3—①. SRM chromatograms of typical samples

- (a) Standard of diniconazole (0.01 mg/kg)
- (b) Green tea blank
- (c) Green tea added with 0.01 mg/kg diniconazole
- (d) Eel blank. Insets show expanded views
- (e) Eel added with 0.01 mg/kg diniconazole.

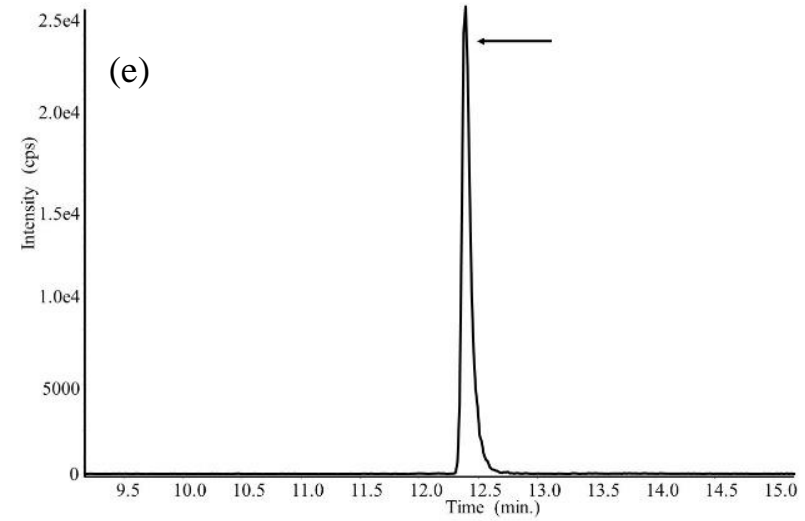
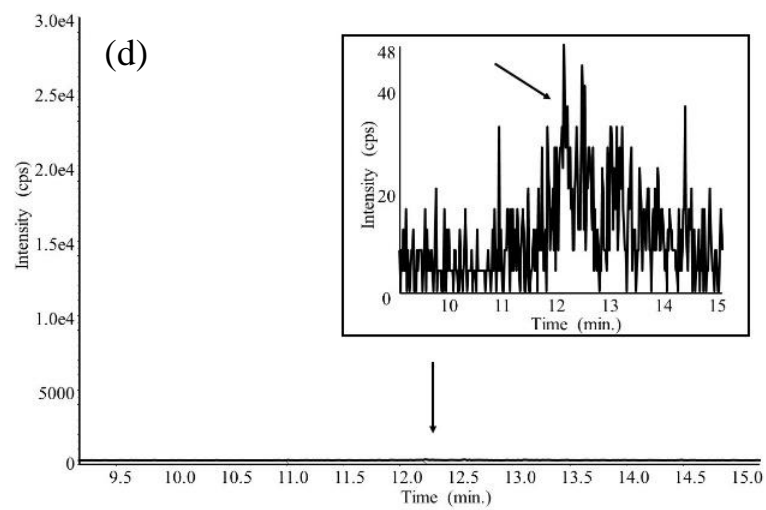
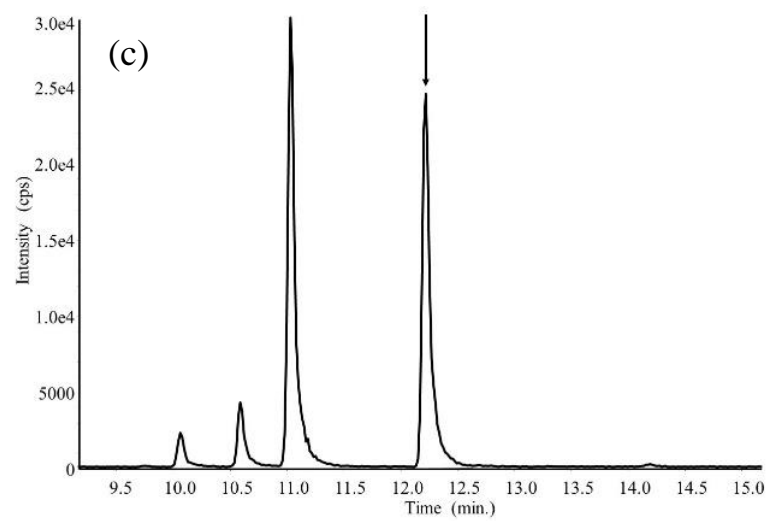
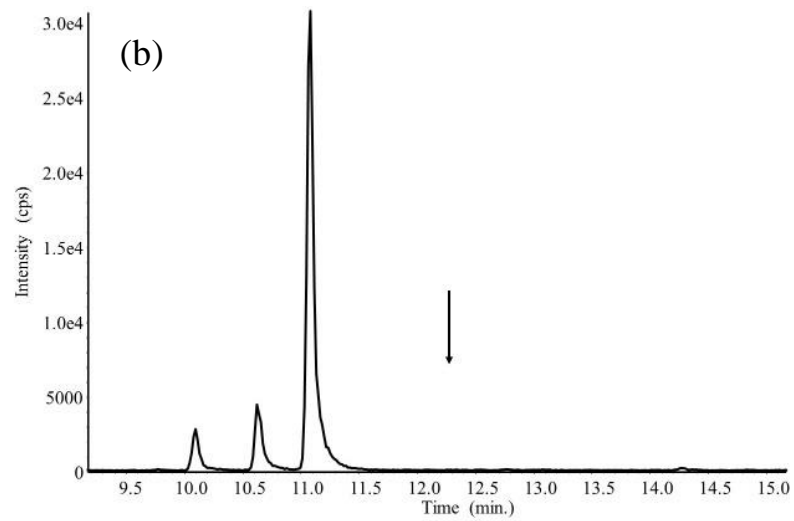


Fig.3—②. SRM chromatograms of typical samples

3. 4. 実態調査

市販されている農産物（小松菜、大根、ネギ、未成熟えんどう、オレンジ）および畜水産食品（牛肉、豚肉、サーモン、鶏卵）の9試料について開発した分析法を用いて分析を行った。その結果、いずれの試料からもジニコナゾールは検出されなかった。また、未成熟えんどうおよび豚肉について添加回収試験を行ったところ、未成熟えんどうで84.0%、豚肉で101.0%であった。

4. 小括

ジニコナゾールは、トリアゾール系の殺菌剤であるが、日本では、農薬として登録されておらず、残留基準値の設定もなされていない。しかし、アメリカ、中国、EUなどでは、残留基準値も設定され、広く使用されている。農場で使用された場合、農作物はもちろん、周辺環境へのドリフトや用途外使用などにより、畜水産物への残留も危惧される。そこで、農産物及び畜水産物中のジニコナゾールの分析法を検討した。

農産物については、試料からジニコナゾールをアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンに転溶した。そのうち、玄米、大豆についてはアセトニトリル/*n*-ヘキサン分配を行って脱脂し、フロリジルミニカラムで精製した。葉緑素を多く含むほうれん草および茶ではグラファイトカーボンミニカラムによる追加精製を行い、LC-MS/MSで定量および確認を行う方法を開発した。

また、畜水産物については、試料から、アセトン-*n*-ヘキサン（1:2）混液で抽出し、次いで、アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配で脱脂し（はちみつを除く）、フロリジルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量および確認する方法を確立した。

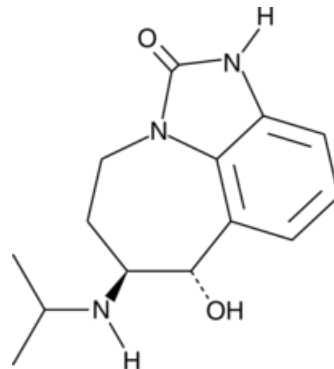
開発した分析法を玄米、大豆、ほうれんそうなど農産物8食品に適用した結果、添加濃度0.01 mg/kgにおける添加回収試験において、真度88.3~103%、併行精度0.5~5.1%の良好な結果が得られた。また、同様に、牛の筋肉、脂肪、鶏卵など畜水産物8食品に適用した結果、真度102~108%、併行精度2.0~4.9%の良好な結果が得られた。

本分析法は農産物および畜水産物の分析法として十分使用できるものと考えられた。また、本分析法は、平成26年11月26日厚生労働省医薬食品局食品安全部長から公定法として通知された⁸⁶⁾。

第2節 LC-MS/MSによる畜産物中のジルパテロールの分析法

1. 緒言

ジルパテロールは β_2 -アドレナリン作動薬であり、脂肪蓄積の抑制、脂質代謝回転の亢進、グリコーゲン分解およびタンパク質合成を介した筋肉増大作用により、牛の増体量、飼育効率および枝肉成績の改善を目的とした動物用医薬品である。ジルパテロールの構造式を図1に示した。



M.W. : 261.32

Log Pow: <1 (25°C)

Fig.1. Structure of zilpaterol

ジルパテロールは1995年にメキシコおよび南アフリカ共和国で初めて承認され、その後、ラテンアメリカ諸国、次いで2006年に米国、2009年にカナダで承認されている。そのため、これらの国から輸入される牛肉等での残留が懸念される事態となった。このような中、台湾⁸⁷⁾において米国産の牛肉からジルパテロールが検出され、問題となった。さらに2011年には台湾で国産のガチョウ⁸⁸⁾からもジルパテロールが検出され、使用が牛以外にも拡大している可能性が懸念されている。

これらのことから、わが国においても米国等からの牛肉の輸入に際し、ジルパテロールの残留が懸念されることから、その試験法の確立が求められることとなった。また、食品安全委員会でもジルパテロールに関する食品健康影響評価が行われ、2013年1月に1日摂取許容量(ADI)を0.083 μ g/kg/dayと評価した⁸⁹⁾。これを受け、2014年8月に牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛の腎臓、牛の食用部分について、0.01ppmの残留基準値が設定された⁹⁰⁾。なお、ジルパテロールにはいくつかの代謝産物が知られているが、薬物動態および残留試験の結果、未変化体のジルパテロールが主要残留物であることから、規制対象はジルパテロールのみとなった。

ジルパテロールの分析法としては、ELISAによる方法^{91), 92)}、イムノバイオセンサーを用いて測定する方法⁹³⁾やGC-MS/MSによる方法^{94), 95)}も

報告されているが、試験対象が限定的で、操作も煩雑である。近年では分析感度や精度の面から、LC-MS/MS による方法が一般的になっている⁹⁶⁾⁻⁹⁹⁾。しかし、試験対象が筋肉、尿、飼料など限定的であり、操作も煩雑なものが多い。

著者らは平成 28 年 4 月 4 日に医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部によるジルパテロール試験法（畜産物）の作成に携わり、残留基準が設定された牛の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓に加えて牛乳および鶏卵を対象にジルパテロールの分析法について LC-MS/MS による方法を作成した。この方法は公定法である通知法¹⁰⁰⁾として発出されたが、マトリックスの影響をさらに低減させるため、この中のカラム精製について更なる検討を行い LC-MS/MS による分析法を確立した。

2. 実験方法

2. 1. 試料

試料は、東京都内の小売店にて市販品を購入した。牛筋肉（国産）、牛脂肪（輸入）、牛肝臓（アメリカ）、牛腎臓（不明）、牛乳（北海道産）および鶏卵（千葉県産）の計 6 種を用いた。

2. 2. 試薬

ジルパテロール標準品は Sigma-Aldrich 社製のジルパテロール塩酸塩（純度 99.3%）を用いた。ジルパテロールとして 10 mg 相当の標準品を精秤し、メタノールに溶解して 100 mL としたものを標準原液（ジルパテロールとして 100 mg/L）とした。この標準原液をアセトニトリル-水（1 : 9）混液で適宜希釈して検量線用標準溶液を作製した。

0.6 mol/L 塩酸含有 50% エタノール水溶液は 36% 塩酸 50 mL にエタノール-水（1 : 1）混液を加えて 1,000 mL としたものをを用いた。

1.2 mol/L 塩酸水溶液は 36% 塩酸 100 mL に水を加えて 1,000 mL としたものをを用いた。

固相抽出カラム：InertSep C18（1 g/6 mL）（以下 C18 ミニカラムとする）（GLサイエンス^株製）、強陽イオン交換ミニカラムとして InertSep SCX（500 mg/6 mL）（以下 SCX ミニカラムとする）（GLサイエンス^株製）を使用した。C18 ミニカラムおよび SCX ミニカラムはあらかじめアセトニトリル-水（1 : 1）混液 10 mL でコンディショニングしたものをを用いた。

その他の試薬：アセトンは富士フイルム和光純薬^株製の残留農薬試験用、アセトニトリルおよび *n*-ヘキサンは関東化学^株製の残留農薬試験

用、塩酸は富士フィルム和光純薬(株)製の試薬特級品（濃度 36%）を用いた。ケイソウ土は富士フィルム和光純薬(株)製のハイフロスーパーセルを用いた。LC-MS/MS の移動相には、関東化学(株)製のアセトニトリルおよび富士フィルム和光純薬(株)製のギ酸それぞれ LC-MS 用を用いた。

2. 3. 装置

ホモジナイザーは SMT COMPANY 社製マルチディスパーサー PB-95、遠心分離機は KUBOTA 社製ユニバーサル冷却遠心機 5930、ロータリーエバポレーターは BUCHI 社製有機溶媒回収装置 V-703 を用いた。高速液体クロマトグラフは(株)島津製作所製 LC-20、質量分析装置は SCIEX 社製 API-4000QTRAP を使用した。

2. 4. LC-MS/MS 測定条件

LC-MS/MS 条件を表 1 に示した。

2. 5. 検量線の作成

ジルパテロール標準原液をアセトニトリル-水（1：9）混液で希釈し、0.625～3.75 ng/mL の濃度範囲の標準溶液を調製し、それぞれ 5 μ L を LC-MS/MS に注入した。得られたクロマトグラムからジルパテロールのピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。

Table 1. LC-MS/MS operating conditions

Parameter	Settings														
LC Conditions															
LC column	Inertsil ODS-4(2.1 mm×150 mm,3 μm)														
Mobile phase	A=0.1 vol% formic acid B=acetonitrile														
Linear gradient elution	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time(min)</th> <th>A(%)</th> <th>B(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> </tbody> </table>			Time(min)	A(%)	B(%)	0	98	2	10	20	80	20	20	80
Time(min)	A(%)	B(%)													
0	98	2													
10	20	80													
20	20	80													
Flow rate	0.2 mL/min														
Column temperature	40°C														
Injection volume	5 μL														
Run time	20 min														
MS Conditions															
Ionization mode	ESI(positive mode)														
Ion spray voltage	5,500V														
Curatin gas (N ₂)	10 psi														
Desolvation temperature	500°C														
Collision gas	6 psi														
Ion source gas 1	30 psi														
Ion source gas 2	50 psi														
Transition															
	precursor <i>m/z</i>	product <i>m/z</i>	Cone Voltage(V)	Collision energy(eV)											
	262.2	185.0 ^{a)}	71	33											
	262.2	244.2 ^{b)}	16	19											
	a) Used for a quantitative analysis		b) Used for a qualitative analysis												

2. 6. 試験溶液の調製

2. 6. 1. 抽出

牛筋肉、牛脂肪、牛肝臓、牛腎臓および鶏卵の場合は、試料に対して重量比で 1/2 量の 0.6 mol/L 塩酸含有 50%エタノール水溶液を加えて均一化したのち、試料 10 g に相当する量を量り採り、*n*-ヘキサン 50 mL を加えてホモジナイズした。さらに、これに *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズしたのち、毎分 3,000 rpm (1,310×*g*) で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を 100 mL メスフラスコに分取した。残った *n*-ヘキサン層と残留物に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 25 mL を加えて同様に操作し、得られたアセトニトリル層を 100 mL メスフラスコに合わせ、

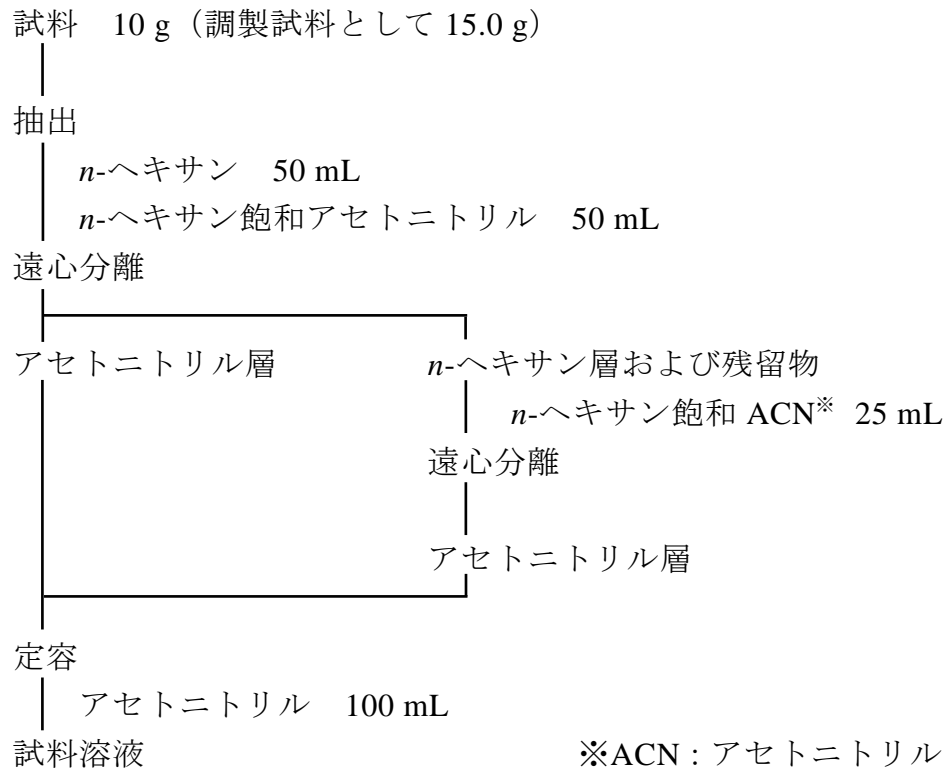
アセトニトリルを加えて正確に 100 mL としたものを試料溶液（試料 0.1 g/mL 相当）とした。

牛乳の場合は試料 10 g を量り採り、1.2 mol/L 塩酸水溶液 2.5 mL を加えたのち、以下筋肉等と同様に操作し、試料溶液（試料 0.1 g/mL 相当）を作製した。

2. 6. 2. 精製

6. 1 で得られた試料溶液 5 mL（試料 0.5 g 相当）を正確に、C18 ミニカラムの下に SCX ミニカラムを接続した 2 段カラムに負荷し、アセトニトリルー水（1 : 1）混液 10 mL で洗浄した。次いで、C18 ミニカラムを取り外し、SCX ミニカラムにアセトニトリルー水（1 : 1）混液および水それぞれ 10 mL を負荷して洗浄後、25%アンモニアアセトニトリル（1 : 99）混液 20 mL で、ジルパテロールを溶出した。溶出液から 40°C 以下で溶媒を留去し、得られた残留物にアセトニトリルー水（1 : 9）混液 2 mL を正確に加えて溶解したものを試験溶液（試料 0.25 g/mL 相当）とした。

畜産物および鶏卵からの分析操作を Schem 1 に示した。



Inertsep® C18 (1 g / 6 mL) (上側) …ODS ミニカラム
 Inertsep® SCX (500 mg / 6 mL) (下側) 接続

試料溶液 5 mL 負荷

アセトニトリル-水 (1 : 1) 10 mL 洗浄

ODS ミニカラムを取り外す

25%アンモニア水-アセトニトリル (1 : 99) 溶出

濃縮

定容

- アセトニトリル-水 (1 : 9) 2 mL

LC-MS/MS

Schem 1. Analytical procedures for zilpaterol in bovine muscle

2. 7. 定量

得られた試験溶液を表 1 に示した LC-MS/MS の操作条件により、測定を行い、得られたピーク面積から絶対検量線によりジルパテロールの定量を行った。

2. 8. 添加回収試験

牛筋肉、牛脂肪、牛肝臓、牛腎臓、鶏卵および牛乳の計 6 種の試料に基準値または一律基準値（共に 0.01 ppm）相当を添加し回収試験を行った。牛脂肪および牛乳以外の試料については、予め 0.6 mol/L 塩酸含有 50% エタノール水溶液と混合して均一化した後、10 g 相当の試料を精秤し、これにアセトンで調製したジルパテロール 0.1 µg/mL 溶液を 1 mL 添加してかくはんし、室温で 30 分間放置した。牛乳については、試料 10 g を精秤し、これに 1.2 mol/L 塩酸水溶液を 2.5 mL 添加してかくはんした後、同様にアセトンで調製したジルパテロール 0.1 µg/mL 溶液を 1 mL 添加してかくはんし、室温で 30 分間放置した。牛脂肪については、予め 0.6 mol/L 塩酸含有 50% エタノール水溶液と混合して均一化した後、10 g 相当の試料を精秤し、試料を 40°C の湯浴上で加温して溶かし、同様にアセトンで調製したジルパテロール 0.1 µg/mL 溶液を 1 mL 添加してかくはんし、-20°C で 30 分間放置して固化した。添加放置後の各試料について、上記の方法に従って操作を行い、真度および併行精度を求めた。

3. 結果および考察

3. 1. 測定条件の検討

3. 1. 1. MS 条件の検討

ジルパテロール（分子量 261.32）を LC-MS/MS で測定するための MS 条件の検討を行った。イオン化モードについてはエレクトロスプレーイオン化法（ESI）を用いることとし、測定モードを選択するために、アセトニトリル溶液で 0.1 µg/mL に調製したジルパテロール標準溶液を用いてインフュージョン測定を行ったところ、プロトン付加分子 $[M+H]^+$ が m/z 262.2 に強く検出されたため、Selected Reaction Monitoring（SRM）条件を検討した。その結果、プロダクトイオンとして、 m/z 244.2 および m/z 185.0 が強く検出された。強度としては、 m/z 244.2 が最も強いが、夾雑成分による干渉を受けることもあったため、イソプロピルアミン、水が脱離したと考えられる m/z 262.2→185.0 を定量イオンとし、水が脱離したと考えられる m/z 262.2→244.2 を定性イオンとした。それぞれのモニターイオンに最適な条件を表 1 に示した。また、それぞれのマスクロマトグラムを図 2 に示した。

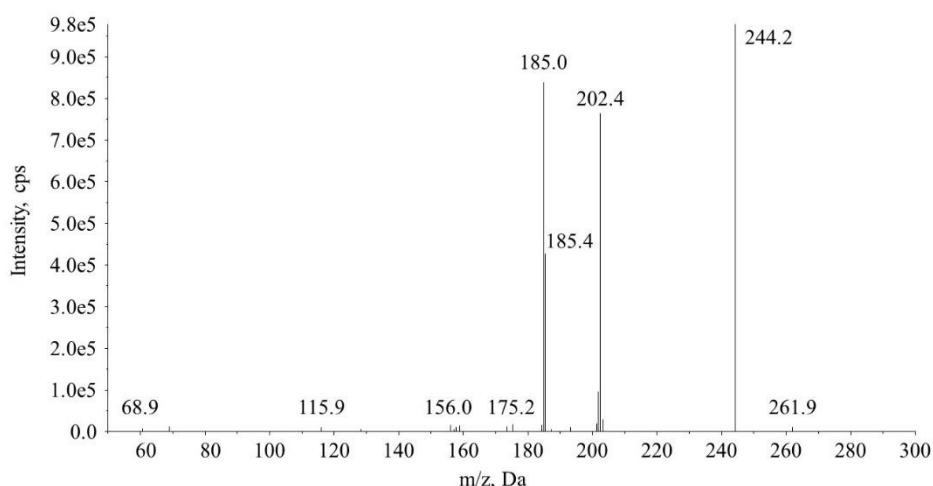


Fig. 2. Mass spectrum of zilpaterol

3. 1. 2. LC 条件の検討

LC の分析条件について検討した。表 1 に示した MS 条件に従いカラムおよび移動相について検討した。カラムには汎用性の高い逆相分配系の ODS カラムを用いることとした。ジルパテロールは塩基性物質であることから、ODS カラムの表面修飾率、シラノール基の残存程度がピーク形状や夾雑物との分離に影響するものと考えられた。そこで、修飾率の異なるエンドキャップ処理された数種の C18 カラムについて検討した。L-column2 ODS ((一財) 化学物質評価機構製)、Symmetry C18 (Waters 社製)、Hypersil GOLD aQ (ThermoFisher 社製) 及び Inertsil ODS-3、Inertsil ODS-4、InertSustainC18 (以上 GL サイエンス社製) の内径 2.0~2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm のカラムについてジルパテロールのピーク形状や感度について検討した。すべてのカラムにおいておおむね良好な結果が得られたが、ピーク形状、再現性等を考慮して Inertsil ODS-4 を採用した。

移動相については、ジルパテロールのイオン化を促進するため、MS の測定にほとんど影響のない低分子の有機酸を用いることとした。移動相の A 液にはギ酸および酢酸を選び、それぞれ 3 濃度 (0.05、0.1 および 0.2 vol%) に調製したものと B 液はアセトニトリルあるいはメタノールとし、その組み合わせについて比較検討した。その結果、A 液に 0.1 vol% ギ酸、B 液にアセトニトリルを用いた場合に最も良好な感度が得られた。以上の結果より、本法ではカラムは Inertsil ODS-4、移動相として A 液は 0.1 vol% ギ酸、B 液はアセトニトリルとし、グラジエントによる分析を行うこととした。

3. 2. 試験溶液の調製

3. 2. 1. 抽出

ジルパテロールの分析法としては、これまで調製した試料中のジルパテロール代謝物の一部をあらかじめ塩酸によって加水分解する方法⁹⁵⁾や β -glucuronidaseによって酵素分解^{96),98)}を行い、代謝産物をも含めて分析する方法が報告されている。今回は規制が未変化のジルパテロールのみであることをふまえ、抽出溶媒の検討を行った。特に畜産物を対象とした場合、脂肪の存在を考慮する必要があり、今回、試料からのジルパテロールの抽出には、畜産物からクレンブテロールなどの β -作動薬の抽出に用いられるアセトン、*n*-ヘキサン-アセトン (1:2) 混液、メタノールおよび *n*-ヘキサンを加えてかくはんした後、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルで抽出するそれぞれの方法について検討した。標準溶液を添加した牛筋肉を用いて検討した結果、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルでは95%以上の回収が得られたが、アセトンでは80%程度、*n*-ヘキサン-アセトン (1:2) 混液、メタノールでは20%程度の回収率だったため、抽出には *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルを用いることにした。さらに、牛脂肪からの抽出は、*n*-ヘキサンを用いて脂肪を融解した後、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルで2回抽出することで95%以上と良好な回収を得ることができた。しかし、牛肝臓における回収率は、35%程度と低かった。牛肝臓において回収率が減少した原因として試料に標準溶液を加えて均一化した後、30分間放置する操作の間に肝臓中の酵素の作用によりジルパテロールが分解されたと推察された。そこで試料を均一化する工程において、酸を添加して酵素を失活させる方法を検討した。なお、他の試料については回収率に影響はほとんど見られなかったが、試験操作を統一するため、すべての試料について酸を添加することとした。

しかし、筋肉や肝臓などの固形試料に酸を含む水溶液を直接添加しても、試料を均一化するのが難しいことから、試料との親和性を良くするためエタノール-水 (1:1) 混液を用いて酸含有溶媒を調製することにした。添加する酸についてはタンパクの凝固剤として用いられる塩酸およびより緩和有機酸としてギ酸について検討した。塩酸を0.5 vol%~5 vol%、ギ酸を1 vol%~10 vol%となるように調製したそれぞれのエタノール-水 (1:1) 混液を肝臓試料10 gに対して3 mL (3 g) 添加してかくはん後、ジルパテロールを加えて30分放置した後、本法に従い *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルを用いて抽出した。その結果、表2に示す通り、塩酸添加の場合は3 vol%以上で、ギ酸添加の場合は10 vol%以上でジルパテロールの回収率は70%程度であった。

Table. 2. Effect of acid type and concentration on recovery

Type of acid added	Recovery (%)
1 vol%FA/ethanol-water mixture (1:1)	60.5
3 vol%FA/ethanol-water mixture (1:1)	60.7
5 vol%FA/ethanol-water mixture (1:1)	66.1
10 vol%FA/ethanol-water mixture (1:1)	68.1
0.5 vol%HCl/ethanol-water mixture (1:1)	55.0
1 vol%HCl/ethanol-water mixture (1:1)	66.5
3 vol%HCl/ethanol-water mixture (1:1)	67.4
5 vol%HCl/ethanol-water mixture (1:1)	76.4

FA : Formic acid HCl : Hydrochloric acid

次に 10 vol%ギ酸、3 vol%塩酸および 5 vol%塩酸のエタノール-水 (1 : 1) 混液の添加量について、肝臓に各溶液をそれぞれ 3, 5, 10mL 添加して比較検討した。その結果を表 3 に示す。試料 10 g に対して 10 vol%ギ酸および 3 vol%塩酸添加では 5 mL で約 80%、5 vol%塩酸添加は 5 mL でほぼ 100%の回収率が得られた。そこで、試料中の酵素を失活させつつ、試料の均一化を図ることを目的に、添加量を少なくするため 1.2 mol/mL 塩酸水溶液を添加することとした。すなわち、液体試料の牛乳には試料 10 g あたり 2.5 mL の 1.2 mol/mL 塩酸水溶液を添加した。一方、牛乳以外の固形試料では試料との相溶性を高めるため、同量のエタノールを添加する必要性が認められた。このため 1.2 mol/mL 塩酸水溶液に代えて 0.6 mol/L 塩酸含有 50% エタノール水溶液を試料に対して重量比 1/2 相当を添加して均一化を図った (試料 10 g あたり 5 mL に相当)。

Table 3. Effect of the amount of acid added on the recovery rate

Type of acid added	Recovery(%)		
	added 3 mL	added 5 mL	added 10 mL
10 vol%FA/ethanol-water mixture (1:1)	68.1	80.6	41.5
3 vol%HCl/ethanol-water mixture (1:1)	67.4	81.6	91.8
5 vol%HCl/ethanol-water mixture (1:1)	76.4	100.1	89.9

FA : Formic acid HCl : Hydrochloric acid

3. 2. 2. 固相抽出ミニカラムによる精製

試料溶液中に混在する夾雑物を除去するためミニカラムを用いた精製を検討した。試料溶液が *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルであることから、比較的幅広い極性の夾雑物の混在が予想された。そこで、低極性の物質は C18 ミニカラムに、塩基性物質であるジルパテロールは陽イオン交換ミニカラムに保持させ、陰イオンなどの他の夾雑物を除去する方法、すなわち C18 ミニカラムと陽イオン交換ミニカラムの二段カラムを用いて精製する方法について検討することとした。まず、筋肉から抽出した試料溶液 5 mL に 1 mg/L のジルパテロール標準溶液 1 mL を添加して C18 カラムに負荷したところ、ジルパテロールは C18 ミニカラムに一部残留したものの大半は、陽イオン交換ミニカラムに移行した。この段階で脂肪等の低極性物質はカラムに保持され、取り除くことができた。次に洗浄溶媒としてアセトニトリル-水 (1 : 1) 混液 10 mL を流すことで、C18 カラムに残留しているジルパテロールを陽イオン交換ミニカラムに完全に移行させることとした。(図 4)

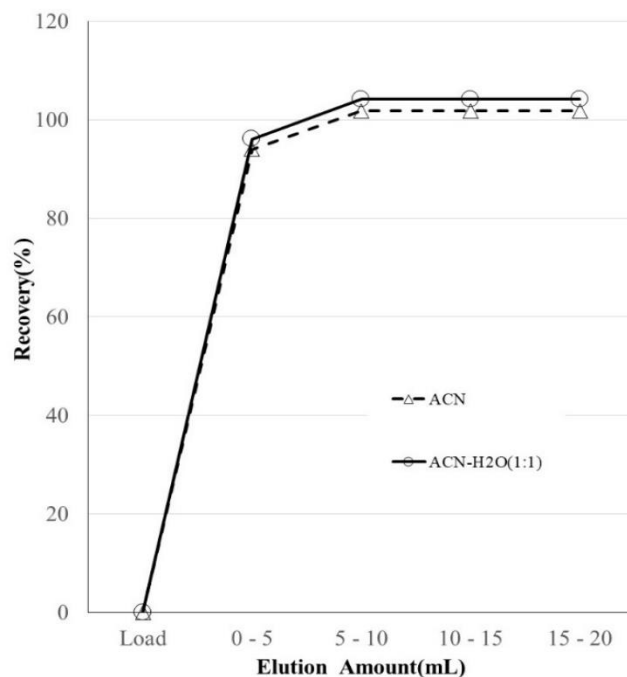


Fig.4. zilpaterol recovery in each fraction from different solvents used for elution from InertSep® C18 cartridges.

One mg/mL of standard solution (solvent composition is the same as the elution solvent) was loaded onto the InertSep® C18 cartridge. It was then eluted with acetonitrile and acetonitrile-water (1:1).

陽イオン交換体カラムは、修飾されたイオン交換基によって選択性が異なり、精製効果に影響を与える。カラムとしてプロピルベンゼンスルホン基を修飾した強陽イオン交換体ミニカラム (SCX ミニカラム)、スルホンプロピル基を修飾した強陽イオン交換体ミニカラム (InertSep PRS ジーエルサイエンス^株製、以下 PRS ミニカラム) 及びカルボキシルエチル基を修飾した弱陽イオン交換体ミニカラム (InertSep CBA ジーエルサイエンス^株製、以下 CBA ミニカラム) について比較検討を行った。アセトニトリルでコンディショニングした各カラムにジルパテロール 1 mg/L 溶液を 1 mL 負荷した後、アセトニトリル 5 mL ずつ計 10 mL 及び 25%アンモニア水とアセトニトリル (1:99) 混液 5 mL ずつ計 20 mL で溶出し、各溶出画分についてジルパテロールの回収を調べた。その結果を表 4 に示した。CBA ミニカラムでは、アセトニトリル画分ではほぼ全量のジルパテロールが流出することが分かった。そこで、ジルパテロールを保持した PRS ミニカラム及び SCX ミニカラムについて洗浄及び溶出溶媒の検討を行った。洗浄にはアセトニトリル—水 (1:1) 混液および水各 10 mL を用い、陽イオン性物質以外の物質を流出させた。なお、通知法⁹⁷⁾では、アセトニトリル—水 (1:1) 混液 10 mL のみの洗浄であったが、水 10 mL での洗浄を追加することでさらに極性成分を除去できることが分かったため、また検出器の保護のためにも水での洗浄工程を加えることとした。

次いで各陽イオン交換ミニカラムからのジルパテロールの溶離には、以後の MS での測定を考慮し、25%アンモニア水とアセトニトリル混液について検討した。アセトニトリルに 25%アンモニア水 1~5 mL を添加してアセトニトリルで 100 mL に定容した各溶液で検討したところ、1 mL の添加で十分な回収率が得られた。溶出液量については、溶出溶液を 25%アンモニア水—アセトニトリル (1:99) 混液とし、PRS 及び SCX ミニカラムに 1 µg/mL のジルパテロール標準溶液 1 mL を負荷し、これに 5 mL ずつ計 25 mL 負荷し、各溶出画分中のジルパテロールを測定した。その結果、いずれのミニカラムにおいても 25%アンモニア水—アセトニトリル (1:99) 混液 20 mL でほぼ全量のジルパテロールが溶出した。

Table 4. Recoveries of zilpaterol from mini column

Cartridge	elution solvent	Recovery (%)									
		Acetonitrile (mL)		Wash-1 ^{*1}	Wash-2 ^{*2}	25% ammonia-acetonitrile(1:99) (mL)					Total
		0-5	5-10	0-10	0-10	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	
InertSep C18 (1 g)		96.1	8.1	-	-	-	-	-	-	-	104.2
InertSep SCX (500 mg)		0	0	0	0	14.8	81.7	1.9	0	0	97.3
InertSep PRS (500 mg)		0	0	0	0	15.1	83.4	0.9	0	0	99.4
InertSep CBA (500 mg)		19.9	80.7	0	0	0	0	0	0	0	100.6
InertSep C18 (1 g)+InertSep SCX (500 mg)		0	0	0	0	1.4	92.0	1.7	0.5	0	95.6

One mL of standard solution (1 mg/L in acetonitrile-water(1:1)) was loaded on each column , and washed acetonitrile-water(1:1) and water ,and eluted 25% ammonia-acetonitril (1:99) .

※1 10 mL of acetonitrile-water(1:1)

※2 10 mL of water

以上の結果から本分析法では二段目のカラムとして汎用性が高く、また、「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法」の総則の試薬・試液リスト¹⁰¹⁾に記載され、さらに一般的に汎用性が高いことから **SCX** ミニカラムを使用することとした。本二段カラムに $1 \mu\text{g/mL}$ のジルパテロール標準溶液 1 mL を負荷し、アセトニトリル-水 (1:1) 混液 10 mL を負荷した後、**C18** ミニカラムを外し、**SCX** ミニカラムをアセトニトリル-水 (1:1) 混液 10 mL 、水 10 mL で洗浄後、25%アンモニア水-アセトニトリル (1:99) 混液 5 mL ずつ計 25 mL を負荷し、それぞれの画分についてジルパテロールの溶出状況を調べた。その結果、表 4 に示す通り、25%アンモニア水-アセトニトリル (1:99) 混液 20 mL でほぼ全量のジルパテロールが溶出した。

これらの精製条件を筋肉以外の試料を用いて効果を確認したところ、それぞれ十分な回収率を得ることができ、**SRM** クロマトグラムにも測定を妨害するピークは確認されなかった。

3. 3. 添加回収試験

牛筋肉、牛脂肪、牛肝臓、牛腎臓、鶏卵および牛乳 の計 6 種の試料について、基準値または一律基準値に相当するジルパテロールを添加し、本法に従って操作した。結果を表 5 に示した。6 試料における真度は 87.0~99.4%、併行精度は 2.4~6.3%と良好な結果が得られた。また、試料マトリックスの影響を確認するため、回収率 100%相当濃度の各マトリックス添加標準溶液と溶媒標準溶液とのピーク面積の比を求めたところ、0.91~1.03であった。脂肪、肝臓および腎臓においてマトリックスの影響が若干見られたが、機器の感度は十分にあるため希釈を行うことで試料マトリックスの測定への影響は少なくなるものと考えられた。図 3 に標準溶液と牛腎臓の **SRM** クロマトグラムを示した。また、その他の試料においても同様の結果が得られた。試料のクロマトグラムに分析の支障となるピークは認められなかった。本法における定量下限は 0.01 mg/kg であった。

Table 5. Recoveries of zilpaterol from livestock products

Sample	Recovery(%)	RSD(%)	Matrix effect [※]
Bovine muscle	90.2	2.4	1.03
Bovine fat	97.9	5.4	0.92
Bovine liver	88.3	6.3	0.92
Bovine kidney	87.0	4.2	0.91
Milk	87.5	4.7	0.96
Egg	99.4	4.5	0.99

※The ration of mean peak area of 2.5 mg/L of zilpaterol fortified to the blank test solution to 2.5 mg/L of zilpaterol standard solution.

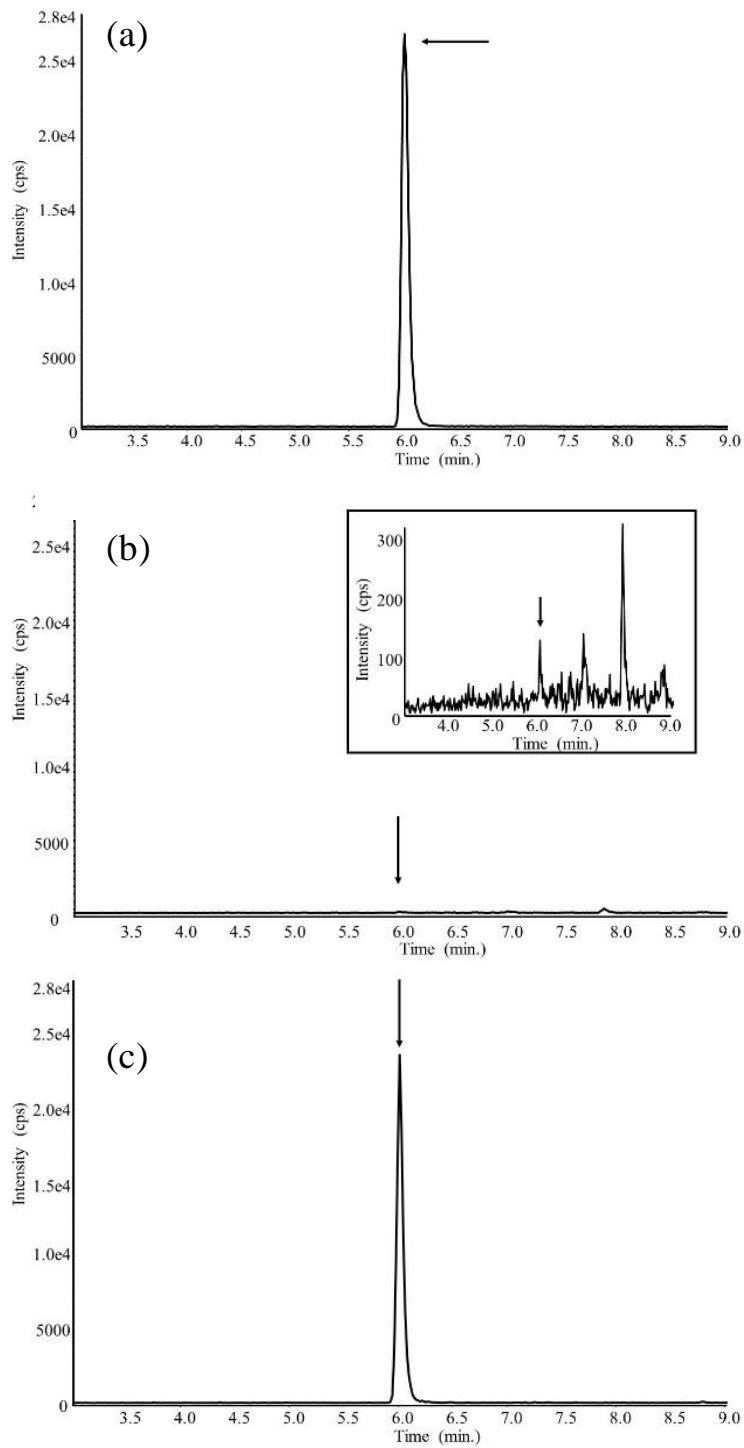


Fig.3. SRM chromatograms of zilpaterol

(a) Standard solution (2.5 ng/mL);

(b) test solution prepared from the bovine kidney sample.

Insets show expanded views;

(c) test solution prepared from the bovine kidney sample fortified zilpaterol at the concentration of 0.01 mg/kg.

3. 4. 実態調査

市販されている畜産食品（牛筋肉 3 試料、牛脂肪 2 試料、鶏卵 2 試料）の 7 試料について開発した分析法を用いて分析を行った。その結果、いずれの試料からもジルパテロールは検出されなかった。また、牛筋肉および鶏卵について添加回収試験を行ったところ、牛筋肉で 92.1%、鶏卵で 104.5%であった。

4. 小括

ジルパテロールは、牛の飼育効率の改善などの目的で用いられる β_2 -アドレナリン作動薬である。1995 年以来、メキシコ、アメリカ、カナダなどで承認されており、これらの国から輸入される牛肉に残留している恐れがある。一方、我が国では牛へのジルパテロールの使用は認められておらず、また、分析法もないことから、早急に牛肉からのジルパテロールの分析法を開発する必要性が生じたため本研究を行った。

分析法の概要は以下の通りである、試料から、*n*-ヘキサン存在下アセトニトリルで抽出し、ODS ミニカラム及び SCX ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量および確認を行った。この分析法を用いて牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛の腎臓、鶏卵および牛乳の畜産物 6 食品に対して添加回収試験を実施したところ、添加濃度 0.01 mg/kg で、真度 87.0~99.4%、併行精度 2.4~6.3% と良好な結果が得られた。

本分析法は、平成 28 年 4 月 4 日厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部長通知（生食発 0 4 0 4）で通知法として発出¹⁰⁰⁾され、保健所の収去試験などに用いられている。

第3章 食品中の有害物質の分析法に関する研究

第1節 LC-MS/MSによる魚粉中のヒスタミンの分析法

1. 緒言

ヒスタミンはタンパク性食品の腐敗の指標となる不揮発性アミンの一つであり、タンパク質を構成するアミノ酸の一つヒスチジンが細菌の持つ代謝系の酵素的作用によって脱炭酸されて生じる。図1に生成過程を示す。このヒスタミンを多量に含む魚介類等の食品を食べることにより、人に対して、摂食後数時間で顔面紅潮、腹痛、じんま疹といったアレルギー様症状を引き起こすことが知られている¹⁰²⁾。特に魚の加工品による食中毒は毎年のように報告されており¹⁰³⁾、食品衛生上、リスク管理が必要な物質とされている。そのため、EUやアメリカでは魚介類に対して規制値が定められているが、我が国では魚介類についてヒスタミンの規制値は定められていない¹⁰⁴⁾。

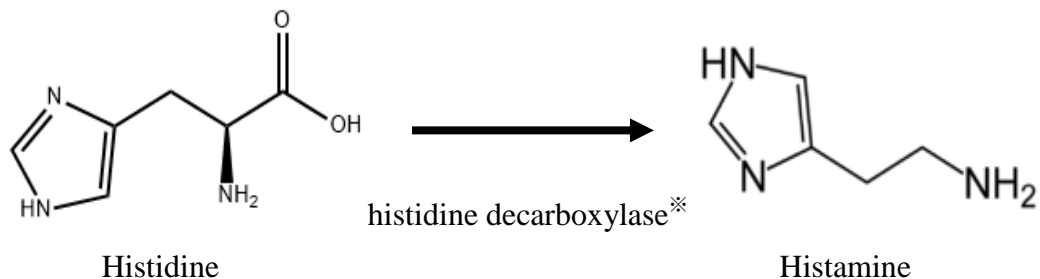


Fig. 1. Histamine production process

※ Ex.) *Morganella morganii*

また、魚は人のタンパク源として重要であると同時に、養鶏や養殖水産業等においても、飼料として重要なタンパク源となっている。動物に対するヒスタミンの影響については詳細な機序は解明されていないが、これまでに鮮度の低い魚粉を与えたブロイラーに胃びらんや潰瘍が発生した例¹⁰⁵⁾⁻¹⁰⁷⁾やサバの胃や腸管に著しい病変を起こした例が報告¹⁰⁸⁾されている。このようなことから、健全な養鶏や養殖を行うためには飼料の安全を担保する必要があり、わが国では飼料の安全性の確保及び品質の改善を図ることを目的に飼料安全法¹⁰⁹⁾が定められている。飼料中のヒスタミンについては基準値の設定はされていないが、魚粉の鮮度を示す指標として位置付けられており、公定法として飼料分析基準にヒスタミンの分析法が示されている^{34), 110)}。飼料分析基準では魚粉を対象にキャピラリー電気泳動法と比色法によるヒスタミン分析法が記載されているが、前者は使用機器の普遍性にやや乏しく、後者は操作が煩雑であるなど問題点がある。このようなことから新たな分析法の開発

が求められている。

一方、現在の食品中からのヒスタミンの分析は、一般的には食品から抽出したヒスタミンをダンシルクロライド^{111)・113)}やフルオレスカミン^{111)・114)・115)}、オルトフタルアルデヒド^{116)・117)}等で蛍光誘導体化したのち、蛍光検出器付きHPLCで測定する方法によって行われるが、これらの方法は誘導体化操作が煩雑で操作に長時間を要する。そこで今回、飼料分析基準の魚粉中のヒスタミン分析法の新たな開発を行うに当たり、近年、誘導体化を行わず操作の簡略化が期待される直接LC-MS/MSで分析する方法^{118)・122)}がいくつか提案されていることから、その適用を試みた。その結果、操作の簡易性、分析精度、再現性等に良好な結果が得られた。

2. 実験方法

2. 1. 試料

試料は、(独)農林水産消費安全技術センターより提供された、魚粉7種類(いずれも業務用、原材料等は不明)と神奈川県内のホームセンターで購入した魚粉を含む鶏用配合飼料2種類及び養魚用配合飼料2種類を用いた。

2. 2. 試薬

ヒスタミン標準溶液：ヒスタミン二塩酸塩(特級、富士フイルム和光純薬株)165.6 mgを正確に量り、0.1 mol/L塩酸に溶解して全量100 mLとしたものを標準原液(ヒスタミンとして1,000 µg/mL)とした。本液10 mLを量り、水を加えて100 mLとしたものを標準溶液(100 µg/mL)とした。

5%トリクロロ酢酸溶液

2%ギ酸含有メタノール-水混液：ギ酸2 mLにメタノール-水(1:1、v/v)を加えて100 mLとした。

5%ギ酸含有メタノール-水混液：ギ酸5 mLにメタノール-水(1:1、v/v)を加えて100 mLとした。

固相抽出カラム：OASIS WCX(500 mg/6 cc)(以下WCXミニカラムとする)(Waters社製)を使用した。WCXミニカラムはあらかじめメタノール10 mL、水10 mLで順次コンディショニングしたものをを用いた。

その他の試薬：アセトニトリルは関東化学株製LC-MS用、ギ酸は富士フイルム和光純薬株製のLC-MS用、その他の試薬は特級品を用いた。

2. 3. 装置

ホモジナイザーはSMT COMPANY社製マルチディスペンサーPB-95、遠心分離機はKUBOTA社製ユニバーサル冷却遠心機5930、ロータリーエバポ

レーターは BUCHI 社製有機溶媒回収装置 V-703 を用いた。高速液体クロマトグラフは(株)島津製作所製 LC-20D、質量分析装置は SCIEX 社製 API-2000 を使用した。

2. 4. 測定条件

LC-MS/MS の測定条件を表 1 に示した。

Table 1. LC-MS/MS operating conditions

Parameter	Settings																	
LC Conditions																		
LC column	Triart Diol-HILIC plus(2.1 mm i.d.×150 mm,3 μm)																	
Mobile phase	A=0.1 vol% formic acid B=Acetonitrile																	
Linear gradient elution	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time(min)</th> <th>A(%)</th> <th>B(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>			Time(min)	A(%)	B(%)	0	10	90	1	10	90	7	90	10	15	90	10
Time(min)	A(%)	B(%)																
0	10	90																
1	10	90																
7	90	10																
15	90	10																
Flow rate	0.2 mL/min																	
Column temperature	40°C																	
Injection volume	10 μL																	
Run time	15 min																	
MS Conditions																		
Ionization mode	ESI(positive mode)																	
Ion spray voltage	5,000V																	
Curatin gas (N ₂)	30 psi																	
Desolvation temperature	300°C																	
Collision gas	3 psi																	
Ion source gas 1	50 psi																	
Ion source gas 2	30 psi																	
Transition																		
	precursor <i>m/z</i>	product <i>m/z</i>	Cone Voltage(V)	Collision energy(eV)														
	112.1	95.1 ^{a)}	41	21														
	112.1	68.1 ^{b)}	41	33														
	a) Used for a quantitative analysis		b) Used for a qualitative analysis															

2. 5. 検量線の作成

ヒスタミン標準溶液を適宜、2%ギ酸含有メタノール水混液を用いて希釈し、0.5~50 μg/L の濃度範囲の検量線用標準溶液を調製し、それぞれ 10 μL を LC-MS/MS に注入した。得られたクロマトグラムからヒスタミンのピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。

2. 6. 試料溶液の調製

2. 6. 1. 抽出

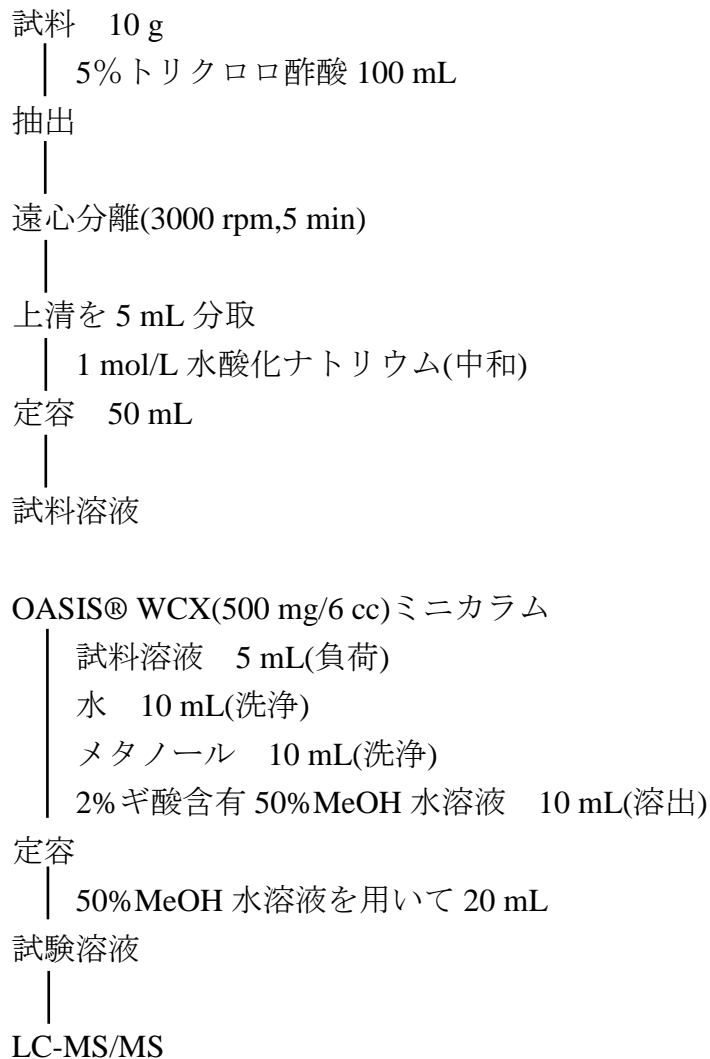
均質化した試料 10.0 g を 200 mL の蓋付きポリプロピレン製遠沈管に採り、これに 5% トリクロロ酢酸溶液 100 mL を加え、30 分間振とう混和して抽出した。次に 50 mL のポリプロピレン製遠沈管に抽出液の一部を採り、3,000 rpm(1,880×g)で 5 分間遠心分離を行った。得られた上澄み液 5 mL をポリプロピレン製遠沈管に分取し、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 7 に調整したのち、3,000 rpm(1,880×g)で 10 分間遠心分離して上澄み液を分取し、水で 50 mL に定容したものを試料溶液とした。

2. 6. 2. 精製

固相抽出カートリッジに試料溶液 5 mL を負荷し、水 10 mL 次いでメタノール 10 mL で洗浄したのち、2%ギ酸含有メタノール-水混液 10 mL で溶出した。この溶出液にメタノール-水 (1 : 1) 混液を加え 100 mL に定容し、試験溶液とした。分析操作を Schem 1 に示す。

2. 7. 定量

得られた試験溶液を表 1 に示した LC-MS/MS の操作条件により、測定を行い、得られたピーク面積から絶対検量線によりヒスタミンの定量を行った。



Schem 1. Analytical procedures for histamine in fish meal

3. 結果および考察

3. 1. 測定条件の検討

LC-MS/MS による飼料からのヒスタミンの分析法は見当たらないが、食品ではアレルギー様食中毒の迅速な検証を目的に、魚の切り身、干物、フライ、煮付け等を対象にいくつかの方法が報告されている¹¹¹⁾⁻¹¹⁷⁾。

今回、魚粉、あるいは魚粉を含む配合飼料からの分析法を開発するにあたり、これらの報告を参考とし検討することとした。

3. 1. 1. MS 条件の検討

ヒスタミンを LC-MS/MS で測定するための MS 条件について検討した。イ

オン化モードについては、既報¹¹⁸⁾⁻¹²²⁾にしたがいエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を用いることとし、測定モードを選択するために、直接注入測定を行った。その結果、プロトン付加分子である m/z 112.1 $[M+H]^+$ が強く検出されたためポジティブモードを採用した。次にこのプロトン付加分子をプリカーサーイオンとして、Selected Reaction Monitoring (SRM、選択反応性モニタリング) モードでの測定条件を検討した結果、衝突誘起解離によって得られたアミノ基が脱離したと考えられる m/z 112.1 \rightarrow 95.1 を定量イオンに、イミダゾールと考えられる m/z 112.1 \rightarrow 68.1 を定性イオンとすることとした。ヒスタミンのマスクロマトグラムを図 2 に示した。

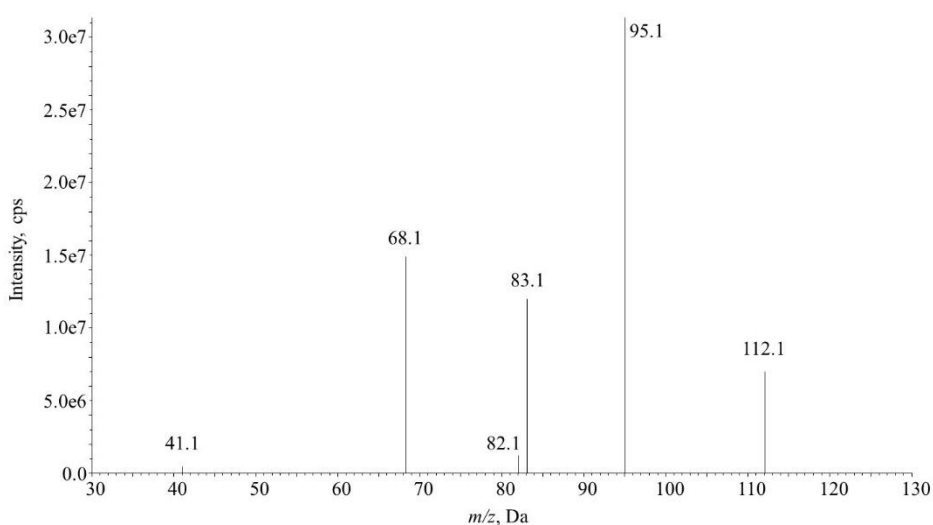


Fig. 2. Mass spectrum of histamine

3. 1. 2. LC 条件の検討

ヒスタミンは、第一級アミンであり、極性の高い成分であるため、MS に適した移動相系では汎用性の高い逆相分配系の ODS カラムには保持されず、測定することが困難であった。そこで、既報¹¹⁶⁾⁻¹²²⁾でもヒスタミンあるいはヒスタミンを含む不揮発性腐敗アミン類の分析に採用されている親水性相互作用を利用した HILIC カラムでの分析を検討することとした。HILIC カラムの充てん剤表面の修飾基の種類は様々であり、メーカーによってそれぞれ異なり、ヒスタミンの分離状況も異なるものと思われる。そこでアミノプロピル基、シアノプロピル基、ジヒドロキシプロピル基など修飾基の異なるカラムを用いて、ヒスタミンのピーク形状や感度について検討した。その結果、親水基としてジヒドロキシプロピル基を化学修飾した Triart Diol-HILIC plus カラムを用いるとシャープなピーク形状が得られることがわかった。そこで、本法ではカラムとして Triart Diol-HILIC plus カラムを用いることとした。

次に Triart Diol-HILIC plus カラムを用いた時の移動相の最適条件について検討した。移動相組成としては、イオン化を促進するための添加剤としてギ酸および酢酸のそれぞれ3濃度(0.05、0.1および0.2%)と有機溶媒としてアセトニトリルおよびメタノールとの組み合わせについて検討した。その結果、アセトニトリル-0.1%ギ酸の組み合わせを移動相として用いた時にヒスタミンの最も良好な感度が得られた。

3. 2. 精製条件の検討

魚粉あるいは魚粉を含む配合飼料は乾燥品であり、生魚の切り身や加工品としての焼魚、煮魚、フライなどから調製した試料溶液と比べ、測定妨害となる夾雑物の含有量が格段に多いものと思われ、LC-MS/MS測定時のマトリックス効果の影響が懸念された。西名ら¹¹⁸⁾は上記のような食品を対象とした場合、試料を10,000倍程度に希釈すればほぼマトリックス効果は無視できるほど小さくなると報告しているが、今回分析対象とした飼料では、魚粉はその乾燥度が高く、抽出される夾雑物も多く、さらに配合飼料では魚粉以外にとうもろこし、マイロ、油かす、ふすま、カキ殻、アルファルファなどが配合されたものもあり、希釈のみではマトリックス効果を排除することはできなかった。また、飼料によって組成成分はさまざまであり、飼料毎にマトリックス検量線を作成するには困難が伴う。そこで、固相抽出カートリッジを用いて精製する方法について検討した。ヒスタミンは、構造にアミノ基を持つ塩基性物質であることから陽イオン交換ミニカラムによる精製が適していると考えられたため、強陽イオン交換ミニカラムとしてOASIS MCX及び弱陽イオン交換ミニカラムとしてOASIS WCXを検討した。その結果、いずれのカラムにもヒスタミンは保持されたが、強陽イオン交換のMCXミニカラムは、固定相にスルホン基を持つことから、ギ酸や酢酸などのカルボン酸系の溶媒ではヒスタミンを溶離することができず、そのためには、塩酸やリン酸などの強酸や塩化ナトリウムなどの塩を含む溶媒系を用いる必要があった。しかし、塩酸やリン酸あるいは塩を含む溶媒の使用はLC-MS/MSの測定において更なる処理が必要となることから適当ではないと判断した。一方、弱陽イオン交換であるWCXミニカラムは、固定相がカルボキシル基であり、ギ酸などの弱酸によってもヒスタミンを溶離することが可能であった。揮発性の酸であるギ酸はLC-MS/MSの測定に影響を与えないことから、本法ではギ酸を含む溶媒系で溶出することとした。

次にWCXミニカラムからのギ酸を含む溶媒系によるヒスタミンの溶出挙動について検討した。ヒスタミン1 µg/mLを含有する5%トリクロロ酢酸溶液5 mLを取り、1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を用いてpH 7としたのち、

WCX ミニカラムに負荷し、水 10 mL、メタノール 10 mL を流下したのち、2%ギ酸含有メタノール-水混液または 5%ギ酸含有メタノール-水混液を 2 mL ずつ各 10 回流下して各画分を分取した。結果は、洗浄溶媒である水及びメタノール画分にはヒスタミンは全く溶出されず、2%ギ酸含有メタノール-水混液及び 5%ギ酸含有メタノール-水混液のどちらの溶出液を用いても 6 mL で全量溶出された。そこで、本法では精製用ミニカラムとして OASIS WCX を用い、溶出溶媒としてギ酸含有量のより少ない 2%ギ酸含有メタノール-水混液 10 mL を用いることとした。本ミニカラムによる精製によって試料に由来するマトリックス効果はほとんど無視できるまで低減することができた。

3. 3. 試料のヒスタミン含有量及び添加回収試験

添加回収試験を行うに先立ち、試料の魚粉、鶏用配合飼料及び養魚用配合飼料について本法を用いてヒスタミンの含有量を調べた。次いでこれらの試料を用いて添加回収試験を実施した。その結果を表 2 に、代表的なクロマトグラムを図 3 に示した。

全 11 試料中、10 試料からヒスタミンが検出された。魚粉では 7 試料中、試料番号 1 の魚粉からは全くヒスタミンは検出されなかったが、6 試料から検出され、その検出値は 8.7~56.0 mg/kg であり、養魚用配合飼料では 5.5 及び 33.7 mg/kg であった。一方、鶏用配合飼料からの検出量は少なく、Tr（定量限界以下： ≤ 5 mg/kg）程度であった。

ヒスタミンが検出されなかった試料番号 1 の魚粉は、他の 6 種の魚粉が茶色から茶褐色をしているのに対し、薄茶色であり、明らかに原材料が異なるか、あるいは鮮度が極めてよいものと思われた。養魚用配合飼料 2 種類においてヒスタミン検出量に差が見られるが、メーカーの違いや魚粉の配合割合、原料の鮮度などによるものと考えられた。また、鶏用配合飼料でのヒスタミン検出量は魚粉と比べ少なかったが、これは配合飼料中の魚粉の配合割合が少ないことを反映したものと思われる。さらにこれらの試料から調製した試料溶液にオルトフタルアルデヒドを用いて蛍光誘導体化した後、蛍光検出器付高速液体クロマトグラフによって試験を行ったところ、検出されたヒスタミンの量は LC-MS/MS の値と概ね一致した。

これらの試料から得られた検出量の 2~4 倍量程度になるようにヒスタミンを添加、すなわち試料 10 g に対し 5.0 mg/kg から 200 mg/kg となるようにヒスタミン標準溶液を添加し、各飼料 3 併行の添加回収試験を実施した。その結果、添加回収率の平均は 79.6~116%、併行相対標準偏差は 1.9~10.3% であり、いずれの試料においても添加回収率 70~120%、併行相対標準偏差

20%以内という良好な結果が得られた。なお、ヒスタミンが検出されなかった試料番号1の魚粉から求めた、 $S/N \geq 10$ 以上となる本法の定量限界は試料中濃度として5 mg/kgであり、また $S/N \geq 3$ で算出した検出限界は1 mg/kgであった。

Table 2. Recoveries of histamine from fish meal and assorted feed

Sample No.	Sample	existing amount (mg/kg)	add amount (mg/kg)	Recovery (mean · %)	RSD (%)
1	Fish meal	ND	5.0	91.0	10.3
2	Fish meal	9.6	10	116	3.6
3	Fish meal	8.7	10	115	3.6
4	Fish meal	36.9	50	104	4.7
5	Fish meal	56.0	200	96.1	5.0
6	Fish meal	33.8	200	99.0	2.8
7	Fish meal	20.2	200	109	3.0
8	Assorted feed for poultry farming	Tr	5.0	102	4.7
9	Assorted feed for poultry farming	Tr	5.0	79.6	8.7
10	Assorted feed for fish farming	5.5	5.0	86.5	6.1
11	Assorted feed for fish farming	33.7	50	105	1.9

ND : not detect Tr: ≤ 5 mg/kg n=3

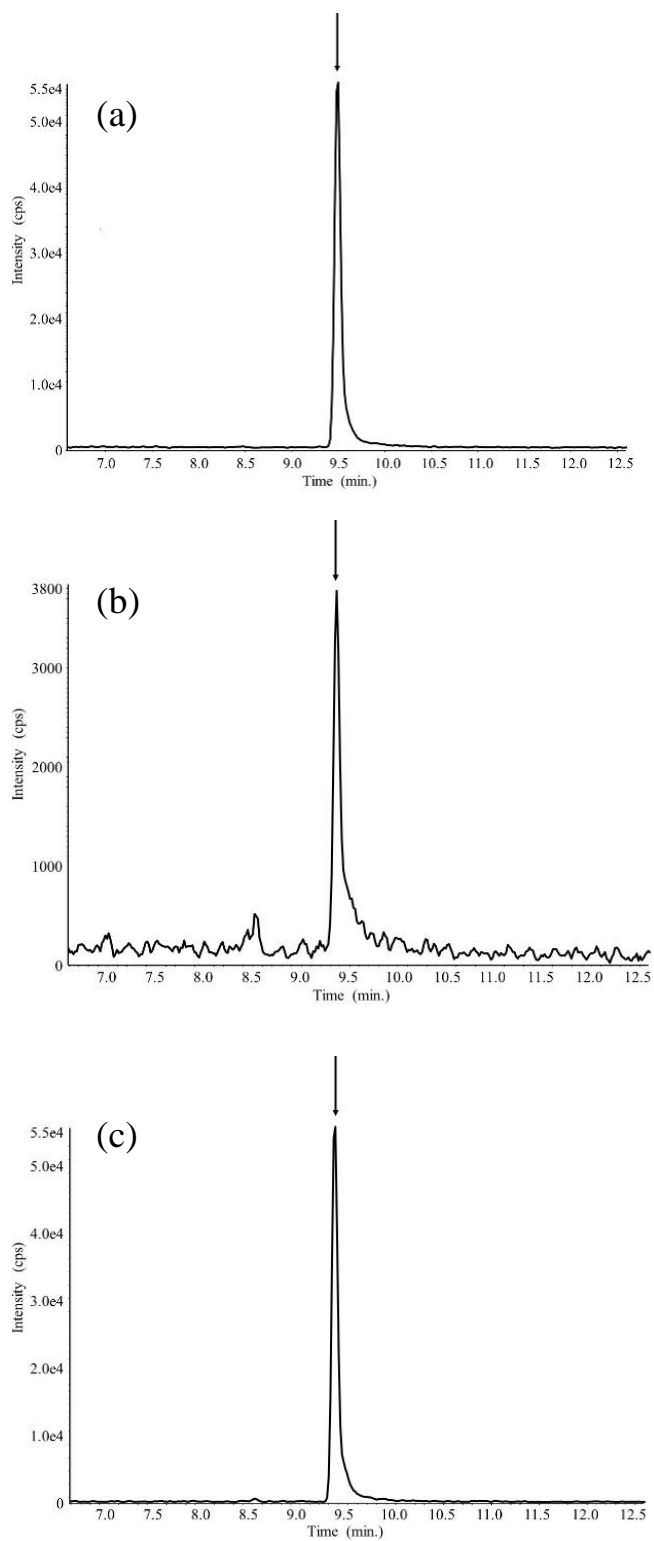


Fig.3. SRM chromatograms of typical samples
(a) Standard of histamine (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
(b) white meal blank. Insets show expanded views.
(c) white meal added with 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ histamine

3. 4. 妥当性評価

試料番号1の魚粉を用いて、本試験法の妥当性評価を厚生労働省から発出されている「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」²⁸⁾に沿って試験者2名、1日3併行を5日間で実施した。試料として用いた魚粉は、ヒスタミンの定量を妨害するピークは検出されず、選択性に問題がないことを確認した。また、本魚粉にヒスタミンの濃度が5.0 mg/kgになるように添加して行った結果は、真度80.7~99.4%、併行精度7.0%、室内精度8.9%であった。妥当性評価ガイドラインの目標値を満たしており、本試験の妥当性が確認された。

3. 5. 食品への応用

開発した分析法は魚粉を主原料とする飼料からのヒスタミンの分析法であるが、魚粉以外にも穀類等を混合した配合飼料にも適用可能であることから、食品としての魚介加工品や発酵食品等にも適用可能ではないかと考えられた。そこで、鮮魚のタラ、マグロ、サバおよび加工食品のかまぼこ、つみれ、鰯の干物、チーズに適用を試みたところ、表3に示す通り、つみれで6 mg/kg、マグロ、鰯の干物、かまぼこ、チーズから若干(≤5 mg/kg)のヒスタミンが検出された。また、これらの試料10 gに対し5.0 mg/kgとなるようにヒスタミン標準溶液を添加し、各試料3併行の添加回収試験を実施した。その結果、添加回収率の平均は86.0~102%、併行相対標準偏差は0.1~1.2%であり、いずれの試料においても添加回収率70~120%、併行相対標準偏差20%以内という良好な結果が得られた。これらの結果から、本分析法は、食品への適用も可能であると考えられた。

Table 3. Recoveries of histamine from fish meal and assorted feed

試験品名	定量値(mg/kg)	回収率(%)	標準偏差
タラ	ND	91.4	0.1
マグロ	Tr	97.2	0.5
干物(鰯)	Tr	86.0	0.4
サバ	ND	93.8	1.2
かまぼこ	Tr	96.2	0.2
つみれ	6	101.7	0.6
チーズ	Tr	86.9	0.1

ND : not detect Tr: ≤5 mg/kg n=3

4. 小括

マグロやサバなどのヒスチジンを多く含む魚は、輸送時や保管時の温度管理が良くないと微生物の影響によってヒスタミンが生成され、ヒスタミンを大量に含んだ食品を摂取すると比較的短時間に顔面紅潮、かゆみ、じんましんなどのアレルギー様症状をきたすことが知られている。

魚やその加工品に由来する食品中のヒスタミンを測定したデータは多数存在しているが、水産養殖や養鶏に用いられる飼料については、測定データも少なく、基準値の設定もされていない。しかし、魚の養殖や養鶏において飼料の主原料に用いられる魚粉は、これらの重要なたんぱく源であり、飼料の鮮度を管理する上でも飼料中のヒスタミン分析は、重要であると考えられる。これまで飼料中のヒスタミンの測定では、飼料分析の公定法である飼料分析基準に記載されているキャピラリー電気泳動と比色法が用いられていたが、前者は普遍的な機器とはいえ、後者は極めて煩雑な操作が必要となる。そこで、新たに養鶏や水産養殖に使用される飼料中のヒスタミンの分析法の開発を行なうことになり、本研究を行った。分析法の概要は、試料を5%トリクロロ酢酸で抽出し、弱陽イオン交換ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで測定する方法である。

ヒスタミンは、極性の高い物質であり、一般的に用いられる ODS 系のカラムには保持されないことから、親水性相互作用を利用した HILIC カラムを用いることでカラムに保持させることができ安定した測定を行うことが可能となった。

本法による魚粉、鶏用配合飼料及び養魚用配合飼料における添加回収率は79.6~116%、併行相対標準偏差は1.9~10.3%と良好な結果を得られた。また、本法の定量限界は、5 mg/kg、検出限界は1 mg/kgとした。従来のキャピラリー電気泳動法、比色法と同程度の定量限界の設定であるが、LC-MS/MSの感度、選択性からさらに低い定量限界値の設定も行えると考えられた。さらに、「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」に沿って作成した試験について妥当性を確認したところ、真度、精度共に良好な結果を得ることができた。

また、食品への適用を試みたところ、真度、精度ともに良好な結果であり、食品への応用も可能であることが示唆された。

本分析法は、平成30年6月29日農林水産省消費・安全局長から通知され飼料分析基準に公定法として採用された。

第2節 LC-MS/MSを用いた生鮮トマト及びトマト加工品中のトマチンの分析

1. 緒言

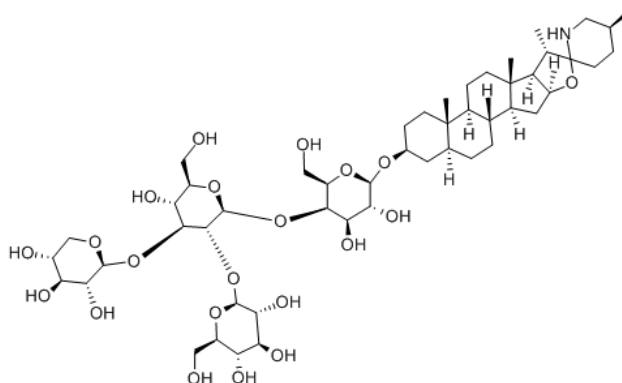
ナス科トマト属のトマト(*Lycopersicon esculentum*)はペルー・エクアドル圏の原産であるが、わが国には18世紀の初めころから栽培され、1930年代に一般に普及した¹²³⁾。世界中で喫食されており、その品種は8,000種を超え、日本においても約250品種¹²⁴⁾農林水産省、2020年6月現在)が栽培されている。トマトは成熟するにしたがってリコピン(赤色成分)とカロテン(黄色成分)が増加し、それにともなってクロロフィルが減少することで、緑色から桃色~赤色に変化する。生食のほか、ホールトマト、トマトピューレー、トマトソース、トマトケッチャップ、トマトジュースなどの形態で幅広く利用されている。トマトは、リコピン、カロテン、ビタミンCなどの含有量が多く、特にリコピンは、がんや心疾患のリスクを低減させるといわれており¹²⁵⁾⁻¹²⁷⁾、体に良いイメージのある野菜である。

一方、生鮮トマトには苦み成分としてアルカロイドの一種トマチンが含まれている。成熟するにしたがってトマチンは減少し、完熟トマトではほとんど消失し、苦みを感じることはあまりないとされる。しかし、完熟したトマトは日持ちしないため、赤味が出始めた未成熟の状態でも収穫される場合もあり、それを食した消費者から苦いと苦情が保健所やメーカーなどに寄せられることがある^{128), 129)}。当所においてもトマトが苦いという消費者からの苦情に対する原因解明の依頼が複数寄せられている。苦味は、味覚の五味(甘味、酸味、塩味、苦味、うま味)において最も感受性が高く、甘味(ショ糖)の認知閾値が0.7%、塩味(塩化ナトリウム)の認知閾値が0.055%とされているが、苦味(ブルシン)の認知閾値は0.0001%とされ¹³⁰⁾、極めて低い。

このようにトマチンは低濃度でも苦いという苦情の原因となるばかりでなく、コリンエステラーゼ阻害や細胞に対する毒性もあることが報告されている¹³¹⁾。そこで、トマト苦情品に対するトマチンの分析、市販の生鮮トマト及び種々の加工品中のトマチン量の把握、さらにはトマトの収穫時期の違いによるトマチン含有量の調査は、食品衛生上有意義なものであると考える。

トマチンの分析法としては、吸光光度法¹³²⁾、バイオアッセイ¹³³⁾、HPLC¹³⁴⁾⁻¹³⁸⁾、LC-MS/MS¹³⁹⁾⁻¹⁴¹⁾によるものが報告されている。その多くは生鮮トマトを対象としており、トマト加工品を対象にしている報告¹⁴²⁾はあまり見受けられない。そこで今回、LC-MS/MSを用い、生鮮トマトのほかトマトソースやトマトジュースといったトマト加工品中のトマチン分析法を開発した。また、収穫時期の違いによるトマト並びに各種トマト加工品中のトマチン含有量および加熱処理によるトマチン量の変化についても調査を行った。

トマチンの構造式を図1に示した。



M.W. : 1034.19

Log Pow: 2.22

Fig.1. Structure of tomatine

2. 実験方法

2. 1. 試料

東京都内、神奈川県内の小売店で市販されていた生鮮トマト 6 種類（品種：不明）とその加工品として缶詰及びレトルト製品、菓子類の計 15 製品を試料とした。また、苦情品のトマト 2 検体も試料とした。収穫時期を変えたトマト（品種：麗容）は栃木県内の農園で栽培されたものを試料とした。

2. 2. 試薬

トマチン標準溶液：トマチン（東京化成工業(株)製）10.0 mg を正確に量り、メタノールに溶解して全量 100 mL としたものを標準原液(トマチンとして 100 μ g/mL 含む)とした。

1%酢酸含有 20%メタノール溶液：酢酸 1 mL をメタノール-水（1 : 4）混液に加え 100 mL とした。

固相抽出カラム：OASIS HLB（500 mg/6 cc）（Waters 社製）を使用した。あらかじめメタノール及び水それぞれ 10 mL でコンディショニングしたものをを用いた。

その他の試薬：アセトニトリルは関東化学(株)製 LC-MS 用、ギ酸は富士フイルム和光純薬(株)製の LC-MS 用、その他の試薬は特級品を用いた。

2. 3. 装置

ホモジナイザーは SMT COMPANY 社製マルチディスペンサー PB-95、遠心分離機は KUBOTA 社製ユニバーサル冷却遠心機 5930、ロータリーエバポレーターは BUCHI 社製有機溶媒回収装置 V-703 を用いた。高速液体クロマ

トグラフは(株)島津製作所製 LC-20D、質量分析装置は SCIEX 社製 API-4000QTRAP を使用した。

2. 4. 測定条件

LC-MS/MS の測定条件を表 1 に示した。

2. 5. 検量線の作成

トマチン標準溶液を適宜、20%メタノール-水混液を用いて希釈し、0.5～10 µg/L の濃度範囲の検量線用標準溶液を調製し、それぞれ 10 µL を LC-MS/MS に注入した。得られた各濃度のピーク面積から検量線を作成した。決定係数 0.999 の良好な検量線が得られた。

Table 1. LC-MS/MS operating conditions

Parameter	Settings																	
LC Conditions																		
LC column	Inertsil ODS-3(2.1 mm×150 mm,3 µm)																	
Mobile phase	A=0.1 vol% formic acid B=0.1 vol% formic acid in acetonitrile																	
Linear gradient elution	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time(min)</th> <th>A(%)</th> <th>B(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>13</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> </tbody> </table>			Time(min)	A(%)	B(%)	0	80	20	3	80	20	13	20	80	20	20	80
Time(min)	A(%)	B(%)																
0	80	20																
3	80	20																
13	20	80																
20	20	80																
Flow rate	0.2 mL/min																	
Column temperature	40°C																	
Injection volume	10 µL																	
Run time	20 min																	
MS Conditions																		
Ionization mode	ESI(positive mode)																	
Ion spray voltage	4,800V																	
Curatin gas (N ₂)	10 psi																	
Desolvation temperture	400°C																	
Collision gas	8 psi																	
Ion source gas 1	20 psi																	
Ion source gas 2	40 psi																	
Transition																		
precursor m/z	product m/z	Cone Voltage(V)	Collision energy(eV)															
1034.6	1016.7 ^{a)}	146	79															
1034.6	255.3 ^{b)}	146	100															
a) Used for a quantitative analysis		b) Used for a qualitative analysis																

2. 6. 試料溶液の調製

2. 6. 1. 抽出

生鮮トマトはヘタを取り除きフードプロセッサーで均質化したものを試料とし、加工品は全量をフードプロセッサーで均質化したものを試料とした。

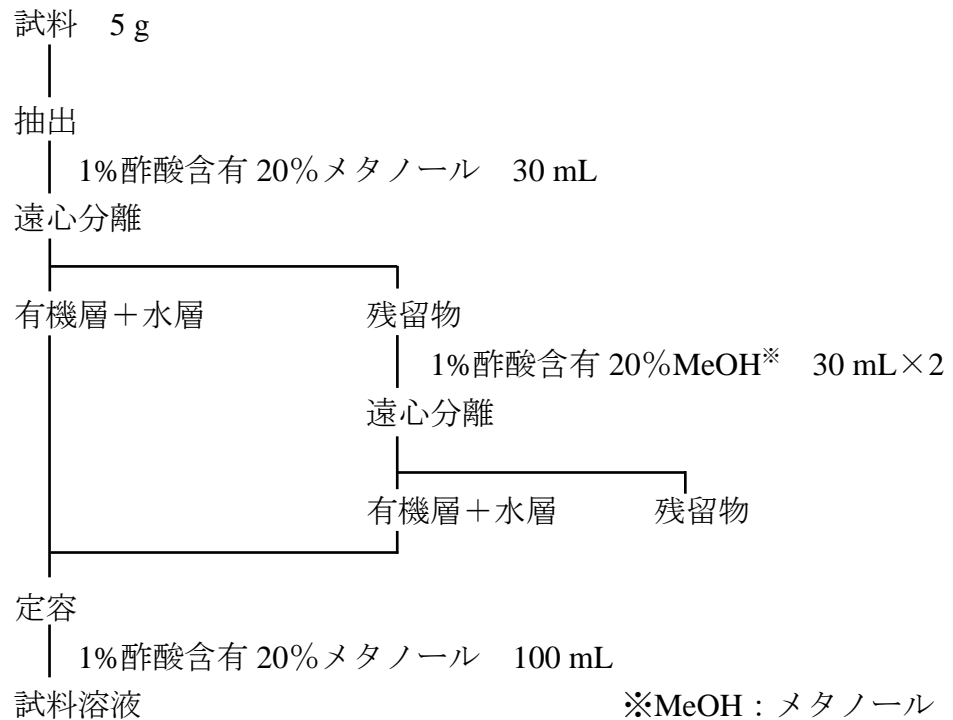
これらの各試料 5.0 g を 100 mL の遠沈管に採り、これに 1%酢酸含有 20%メタノール溶液 30 mL を加え、1 分間ホモジナイズして抽出した。次に 3,000 rpm(1,880×g)で 10 分間遠心分離を行い、得られた上澄液を 100 mL メスフラスコに分取した。さらに残渣に 1%酢酸含有 20%メタノール溶液 30 mL を加え、同様の操作を 2 回繰り返す、得られた上澄液をメスフラスコに合わせ、1%酢酸含有 20%メタノール溶液で 100 mL に定容したものを試料溶液とした。

2. 6. 2. 精製

固相抽出カートリッジに試料溶液 5 mL を負荷し、水 10 mL、次いで 50%メタノール溶液 10 mL で洗浄したのち、メタノール 10 mL で溶出した。この溶出液を減圧下で濃縮した後、残渣にメタノール-水 (2 : 8) 混液を 2 mL を加えて溶解したものを試験溶液とした。分析操作を Schem 1 に示す。

2. 7. 定量

得られた試験溶液を表 1 に示した LC-MS/MS の操作条件により、測定を行い、得られたピーク面積から絶対検量線によりトマチンの定量を行った。



OASIS® HLB (500 mg / 6 cc/)

試料溶液 5 mL 負荷
水 10 mL (洗浄)
50%メタノール溶液 10 mL (洗浄)
メタノール 10 mL (溶出)

濃縮

定容

メタノール-水 (2 : 8) 2 mL

LC-MS/MS

Schem 1. Analytical procedures for tomatine in tomato

3. 結果および考察

3. 1. 測定条件の検討

トマチンを含むトマトアルカロイド配糖体を LC-MS/MS で分析した例はいくつかみられる¹³⁹⁾⁻¹⁴¹⁾。しかし、いずれも構造解析や生体内代謝におけるアルカロイドの消長に関する報告であり、トマト果実や加工品中のトマチンの分析を行ったものではないが、MS 条件の設定にあたっては、これらを参考に

新たに MS 条件の検討を行った。

3. 1. 1. MS 条件の検討

Cataldi らの報告¹³⁹⁾を参考にトマチンを LC-MS/MS で測定するための MS 条件について検討した。イオン化モードとしてエレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法) を採用し、イオン化条件を検討したところ、ポジティブモードにおいてトマチンのプロトン化分子イオン $[M+H]^+$ の生成が確認された。次に、Selected Reaction Monitoring (SRM、選択反応性モニタリング) モードにおける測定条件について検討した。トマチンの m/z 1034.6 $[M+H]^+$ をプリカーサーイオンとして、衝突誘起解離によって得られるフラグメントイオンの測定条件を最適化した。図 3 にトマチンのマススペクトルを示す。アルカロイド骨格と単糖が結合した構造であるため、弱いエネルギーでは、 $[M+H]^+$ の 1034.5 が大きく観察された。最適なコリジョンエネルギーを与えることで、いくつかのフラグメントイオンが観察されたが、水が脱離したと考えられる m/z 1034.6 \rightarrow 1016.7 を定量イオンに、配糖体の糖部分を構成するグルコース、ガラクトースおよびキシロースの各糖が脱離したアグリコン部分であるトマチジンに由来すると考えられる m/z 1034.6 \rightarrow 416.3 を定性イオンとすることとした。トマチンのモニターイオンおよび最適測定条件を表 1 に示した。また、トマチンのマスクロマトグラムを図 2 に示した。

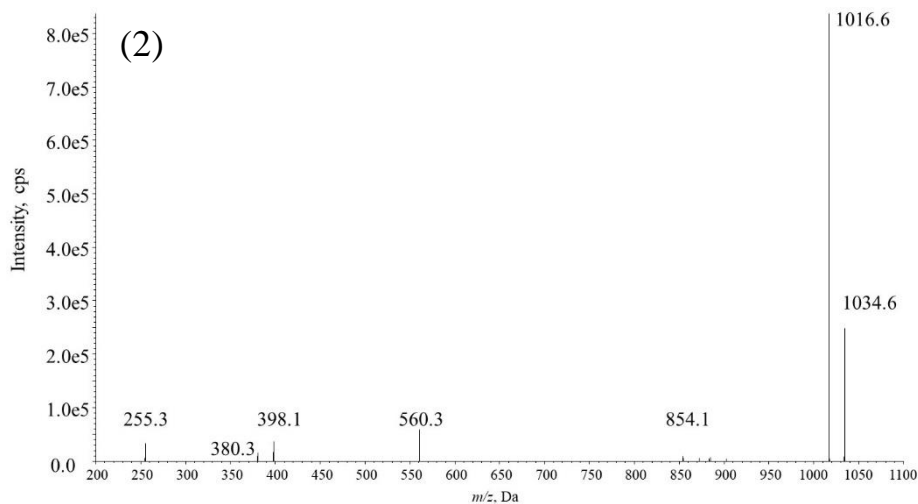
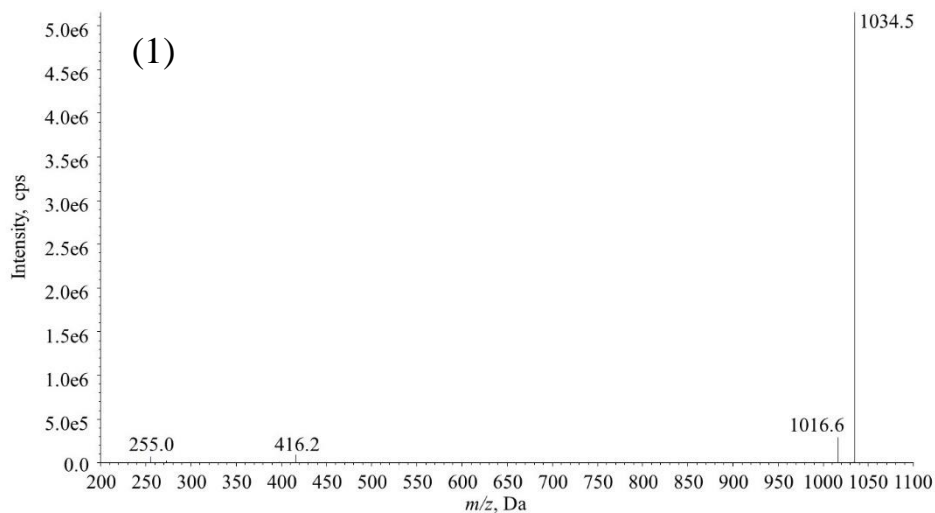


Fig. 2. Mass spectrum of tomatine

(1) Collision energy : 65 eV、(2) Collision energy : 95 eV

3. 1. 2. LC 条件の検討

トマチンのプロトン化分子イオン[M+H]⁺の生成が確認されたことから、プリカーサーイオンの生成を促進させるため、移動相には 0.1 vol%ギ酸を添加することとし、0.1 vol%ギ酸-アセトニトリル系を選択し、種々の ODS カラムについて検討した。その結果、良好なピークが得られた Inertsil ODS-3 (GLサイエンス社製、粒子径 3 μm、内径 2.1 mm、長さ 150 mm) を分析カラムとした。

定量限界は、S/N ≥ 10 から算出すると 0.001 mg/100g は十分に担保できた。しかし、苦みの閾値と食品衛生的観点から低濃度に定量限界を設定する必要がないため、0.01 mg/100g とした。

3. 2. 抽出方法の検討

トマトからのトマチンの抽出には、メタノール^{129), 134)}、1%酢酸¹³³⁾、2%酢酸含有50%メタノール¹³²⁾、0.1%ギ酸含有20%メタノール¹⁴²⁾などが用いられているが、トマチンが塩基性窒素を含むアルカロイド配糖体であることから、抽出にはメタノールあるいはメタノール-水系の混合溶媒に酸を加えた極性溶媒を用いる方法が有用であると考えられた。そこで、酸として酢酸を用い、メタノールと酢酸の混合溶媒系について検討した。はじめに、生鮮トマト試料5gに対してトマチン標準10 μ gを添加し、メタノール濃度が0%、10%、20%と低い溶媒系と80%および90%の高い溶媒系を調製し、これに酢酸を1%および2%になるように加えた抽出溶媒で試行数3回の回収試験を行った。その結果を図3に示した。

その結果から、1%酢酸含有20%メタノールを抽出溶媒として用いることとした。

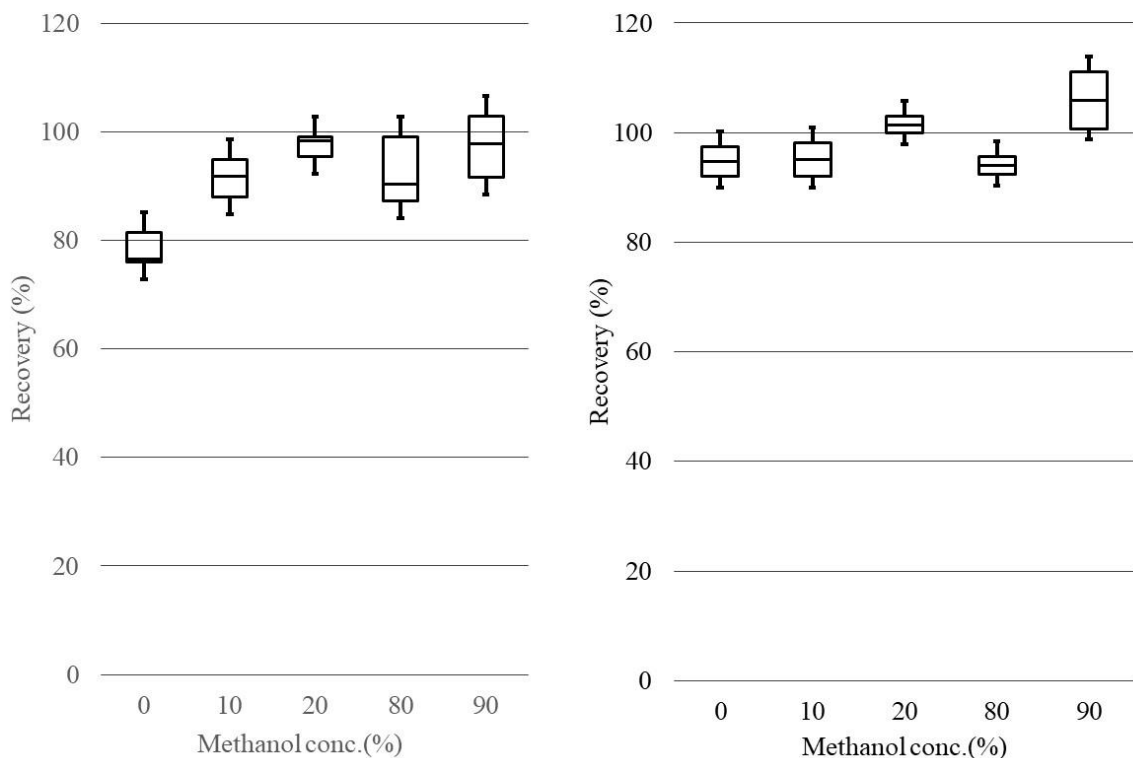


Fig.3. Effect of methanol and acetic acid concentrations on tomatine extraction rate

(a)acetic acid concentration 1% ; (b)acetic acid concentration 2%

3. 3. 精製条件の検討

今回、トマチンの分析は、生鮮トマトだけではなく、ホールトマト、トマトケチャップのような加工品、さらに菓子などを分析対象としているため、測定妨害となる夾雑物が多いと思われたことから、固相抽出カートリッジを用いた精製条件を検討した。トマチンの精製には、C18 ミニカラム¹³⁴⁾ や OASIS HLB¹²⁹⁾ といった逆相系やポリマー系のミニカラムが多く用いられている。そこで、OASIS HLB(Waters 社製、3cc/60 mg)、OASIS HLB(Waters 社製、6cc/500 mg)及び PLEXA (Waters 社製、6 cc/200 mg) の3種類のポリマー系の固相ミニカラムを用いて検討した。

はじめに、トマチンのカラム内での挙動について確認した。1%酢酸含有20%メタノール溶液で調製した0.1 mg/Lのトマチン標準溶液1 mLをあらかじめコンディショニングしたそれぞれのカラムに負荷した。その結果、いずれのカラムでもトマチンは保持された。次に固相ミニカラムの洗浄溶液として、メタノール-水混液を用いることとし、その組成比率及びメタノールによる溶出について検討した。先程の標準溶液を負荷した固相ミニカラムに、メタノール濃度を0、20、50%とした各洗浄溶液を2 mLずつ計10 mL、さらに、メタノールを2 mLずつ計20 mLまで溶出した。

水、20%メタノール、50%メタノールでは、いずれの固相ミニカラムからもトマチンは溶出しなかった。そこで、高極性の夾雑物を取り除くため、最初に、水10 mLで、次いで50%メタノール10 mLで洗浄することとした。一方、メタノールでは、どの固相ミニカラムからも6 mLでトマチンが溶出した。そこで、水10 mL、50%メタノール10 mLで洗浄を行った後、メタノール10 mLでトマチンを溶出することとした。

次に、実際の試料を用いて固相ミニカラムからの溶出状況を検討した。生鮮トマトを1%酢酸含有20%メタノールで抽出した試料溶液に、10 mg/Lのトマチン標準溶液1 mLを添加して100 mLに定容した抽出液を先に検討した各カラムに5 mL負荷した。水10 mLおよび50%メタノール10 mLで洗浄を行った後、溶出溶媒としてメタノールを5 mLずつ、20 mLまで溶出して、各画分での溶出率を確認した。その結果を表3に示す。OASIS HLB (3cc/60 mg) および PLEXA (6cc/200 mg) では、洗浄画分である50%メタノール10 mLでトマチンの89.2%および68.2%が溶出した。一方、OASIS HLB (6cc/500 mg) は、50%メタノールでも溶出することはない、メタノール10 mLで95%の回収率が得られた。カラムによる溶出状況の違いはカラムの充填量が小さいものは、実試料に対しては保持容量が十分ではなかったものと考えられた。そこで、精製には、OASIS HLB (6cc/500 mg) を用いて、試料溶液を負荷後、水10 mL、50%メタノール10 mLで洗浄を行った

後、メタノール 10 mL で溶出することとした。

Table 2. Recoveries of tomatine from mini column

process	Recovery (%)		
	OASIS HLB 3cc	OASIS HLB 6cc	PLEXA 6cc
Load	0.0	0.0	0.0
Wash 1 ※ ¹	0.0	0.0	0.0
Wash 2 ※ ²	89.2	0.0	68.2
Elute 1 ※ ³	2.0	88.4	24.1
Elute 2 ※ ³	0.0	7.4	0.0
Elute 3 ※ ³	0.0	0.0	0.0
Elute 4 ※ ³	0.0	0.0	0.0
total	91.2	95.8	92.3

One mL of standard solution (1mg/L, 1% acetic acid/water-methanol (4:1)) was added to the sample solution extracted from fresh tomatoes and loaded into each column, washed with water and 50% methanol , and methanol was eluted. n=3

※1 10 mL of water

※2 10 mL of 50% methanol

※3 Five milliliters of eluted fraction(methanol) was collected .

3. 4. 添加回収試験

作成した分析法を用いて、生鮮トマト 3 試料、青みがかったトマト 1 試料、トマトジュース、ケッチャップなどの加工品 7 種類を用いて添加回収試験を行った。添加濃度は、定量限界の 0.01 mg/100g で行った。その結果を表 3 に示した。4 種類のトマトでは、真度 80.3~94.8%、併行精度 1.9~5.2%、7 種類の加工品では、真度 76.8~95.5%、併行精度 3.1~9.0%の良好な結果が得られた。

Table 3. Recovery of tomatine from tomato and tomato products

No.	Sample	Recovery(%) (Mean±RSD)
1	Fresh tomato	86.9 ± 1.9
2	Fresh tomato	94.8 ± 2.4
3	Bluish tomato	83.3 ± 3.5
4	Fresh tomato(reiyou)	80.3 ± 5.2
5	Pasta sauce	92.7 ± 6.2
6	Ketchup	88.0 ± 3.1
7	Cut tomato(canning)	76.8 ± 9.0
8	Whole tomato(canning)	91.8 ± 3.6
9	Snacks	95.5 ± 8.3
10	Candy	78.9 ± 6.7
11	Tomato juice	83.0 ± 7.9

Spiked level:0.01 mg/100 g, n=3

3. 5. 苦情検体への適用

3. 5. 1. 苦情品のトマチン分析

今回、作成した分析法を用いて苦情品のトマト2試料についてトマチンの分析を行った。これらのトマトはそれぞれ消費者から苦いと苦情でスーパーマーケットに返品されたもので、果実は赤く色づいていたが、いずれもヘタの周辺は一部青みがかかった状態であった。産地、収穫時期、品種等については不明であった。いずれも3名のパネリストで行った官能検査では明らかな苦みを感じた。分析の結果、2試料の苦情品から1.04 mg/100 g(0.00104%)および1.54 mg/100 g(0.00154%)のトマチンが検出された。トマトの苦いという苦情事例については、粕谷らの報告¹²⁹⁾があり、HPLCによってトマチンを分析した結果、0.78 mg/100 g(0.00078%)検出したと報告しており、今回の苦情品の結果とも近似した値であった。

3. 5. 2. トマトの成熟の程度によるトマチン含有量の変化

苦情品のトマトはほぼ全体が赤いにも関わらずヘタの周辺が若干青い程度で苦みを感じたことから、栽培中のトマト(品種:麗容)を継続的に採取し、トマチン含有量を調べた。採取したトマトの状態を写真に示した。トマチン含量の結果を表4に示した。青い未成熟のトマト(採取0日目)では

5.13 mg/100 g、へたの周辺が青いトマト（10日目）では 1.10 mg/100 g、赤く完熟したトマト（15日目）では 0.02 mg/100 g のトマチンが検出された。採取 10 日目のへたの周辺が青いトマトでのトマチン含有量は苦情品と同程度であり、赤色の程度も同じような状態であった。また、これらの採取品について 3 名のパネリストで官能検査を実施したところ、未成熟のトマトでは全員が舌を刺すような苦みを感じた。へたの周辺が青いものでも明らかに苦みを感じたが、完熟したものでは苦みは感じなかった。したがって、人が感じる苦みの閾値が 0.0001%¹³⁰⁾という報告もあることから、人の感受性の程度には違いはあるものの 1.0 mg/100 g (0.001%) 前後は、多くの人で苦みを感じるレベルであると思われる。

Table 4. Determination of tomatine in complaint tomato and picked tomato during in cultivation

Sample	Content (mg/100 g)	RSD(%)	Bitterness ^{※1}	Production area
Complaint tomato ^{※2}	1.08		+	unknown
Complaint tomato ^{※2}	1.54		+	unknown
Ripe tomato ^{※3}	0.02	9.0	-	Tochigi
Bluish tomato ^{※3}	1.10	8.0	+	Tochigi
Immature tomato ^{※3}	5.13	2.2	#	Tochigi

※1 Gustatory test by 3 panelists. Strong bitterness ; # Some bitterness ; +

No bitterness ; - ※2 Complaint tomato is brought in as bitter by consumer.

※3 Variety name ; Reiyuu

(a)



(b)



(c)



Photo. The degree of ripeness of the collected tomatoes
(a) Immature tomato , (b) Bluish tomato , (c) Ripe tomato

3. 6. 市販生鮮トマトとトマト加工品の実態調査

全体が赤くてもへタの周辺が青い状態のトマトは苦く感じる場合があり、苦情の対象になりうることが分かった。そこで、市販品の生鮮トマト 6 試料についてトマチン含有量の分析を行った。一方、トマトケチャップなどの加工品は使用される原料トマトの品種や栽培法が市販の生鮮トマトと異なるとされるが¹²³⁾、トマチン量の推移は市販品と大きな違いはないと思われる。そこで、その他のトマト加工品についても完熟前のトマトが使用される場合もあるのではないかと考え、トマトケッチャップのほかパスタソース、トマトジュース、スナック菓子等 15 試料についてトマチン含有量の調査を実施した。それらの結果を表 5 および表 6 に、代表的なクロマトグラムを図 4 に示した。

生鮮トマトのうち、No. 6 の生鮮トマトは苦情品と同様にへタの周辺が若干青みを帯びていたが、そのトマチン含有量は 0.06 mg/100g であり、苦みは感じられなかった。その他の赤く完熟した生鮮トマトは、トマチン含有量は 0.02 mg/100g 以下であり、苦みも全く感じなかった。

加工品については、トマトソース 3 試料のトマチン含有量は 0.57~0.97 mg/100 g、ケチャップ 3 試料は 0.65~1.11 mg/100 g であった。数値からは苦みを感じるレベルのものもあったが、ほとんど苦みを感じることはなく、おそらく調味料などによるマスキング効果によるものと思われる。また、トマトの缶詰からは 0.64~0.71 mg/100 g、トマトジュースでは 0.17 および 0.63 mg/100 g 検出された。Ciara らは¹⁴²⁾ トマトの缶詰で 0.11~1.57 mg/100 g、トマトソースで 0.18~0.19 mg/100 g と報告しており、差異のない結果であった。

Table 5. Tomatine containing survey in raw tomatoes

No.	Sample	Content (mg/100 g) (Mean±RSD)	Bitterness ^{※1}	Production area
1	Fresh tomato	0.01 ± 10.6	–	Hakodate
2	Fresh tomato	≤0.01 ± 11.7	–	Hakodate
3	Fresh tomato	≤0.01 ± 7.4	–	Aichi
4	Fresh tomato	≤0.01 ± 5.2	–	Nasukogen
5	Fresh tomato	0.02 ± 4.7	–	Nagano
6	Fresh tomato ^{※2}	0.06 ± 4.4	–	Fukuoka

※1. Gustatory test by 3 panelists. – ; No bitterness

※2. Greenish tomato around the stem

Table 6. Tomatine containing Survey of tomato products

No.	Sample	Content (mg/100 g) (Mean±RSD)	country of manufacture
1	Pasta sauce	0.97 ± 6.3	Japan
2	Pasta sauce	0.69 ± 11.6	Japan
3	Pasta sauce	0.57 ± 8.2	Japan
4	Ketchup	0.58 ± 1.0	Japan
5	Ketchup	0.71 ± 7.3	Netherlands
6	Ketchup	1.11 ± 11.4	Japan
7	Cut tomato(canned)	0.78 ± 9.2	Italy
8	Cut tomato(canned)	0.60 ± 6.8	Italy
9	Whole tomato(canned)	0.64 ± 8.1	Japan
10	Snacks	0.06 ± 6.2	Japan
11	Snacks	3.05 ± 10.9	Thailand
12	Candy	0.03 ± 2.3	Japan
13	Candy	0.16 ± 3.5	Japan
14	Tomato juice	0.63 ± 4.1	Japan
15	Tomato juice	0.14 ± 5.5	Japan

n=3

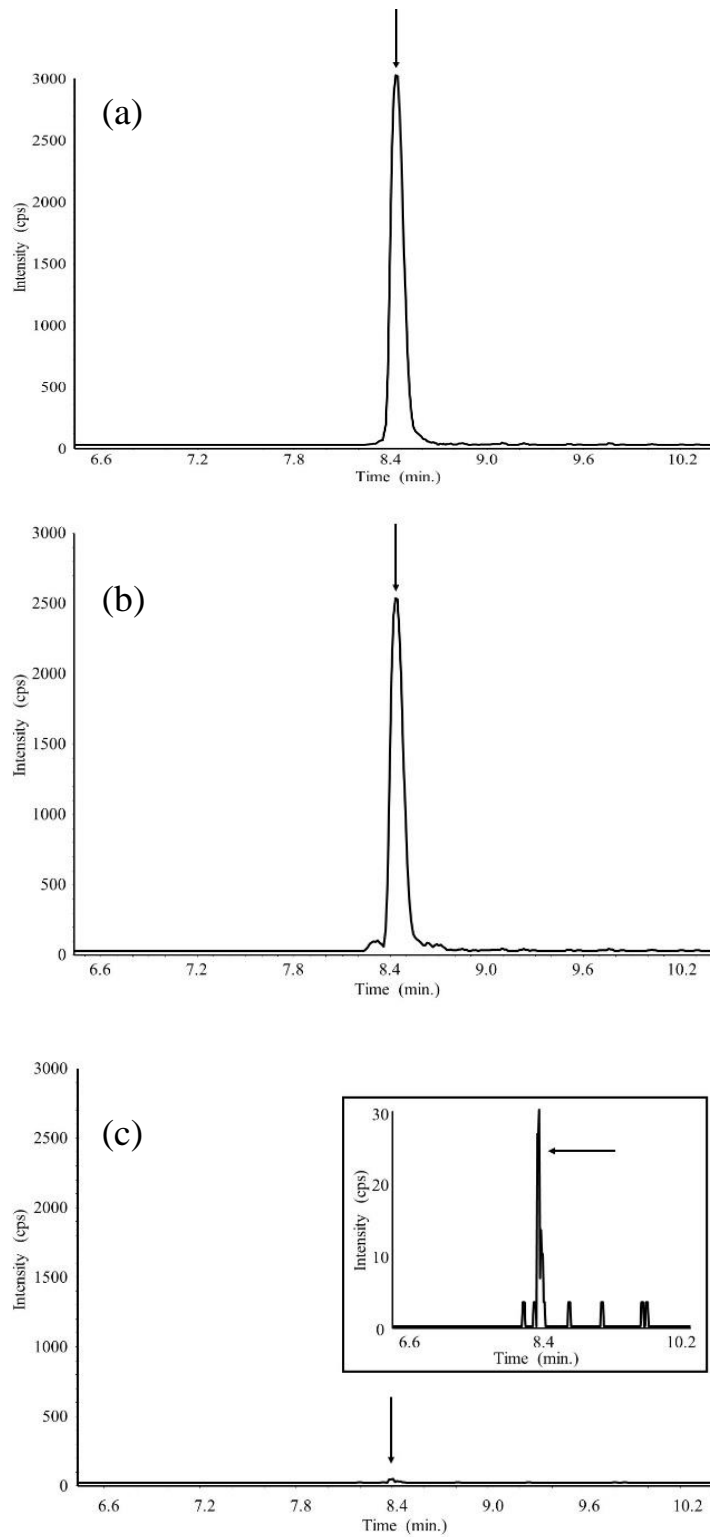


Fig. 4. SRM chromatograms of tomatine
(a) Standard solution (0.5 ng/mL) (b) test solution prepared from tomato sample
(c) test solution prepared from tomato product(ketchup) sample. Insets show expanded views

一方、菓子類の中ではスナック菓子から 3.05 mg/100 g と比較的高濃度のトマチンが検出された。この菓子は、トマトを乾燥させ、塩と油のみで味付けされたドライトマト様のものであり、若干の苦みと塩味のあるお菓子であった。水分量を測定したところ、1.4 g/100 g であった。日本食品標準成分表（8訂）のトマトの水分量から換算すると、濃縮率は 16 倍程度と推定され本製品は、トマチンが濃縮されたものと考えられた。

また、キャンディーやトマトジュースでは、他の野菜がブレンドされたものなど、加工度の高いものは、原料であるトマトの使用量が少ないと思われ、トマチン量が比較的低かった。

3. 7. トマチン量に及ぼす加熱工程の影響

加工品の調査で苦みを感じるレベルのトマチンが検出されるものがあつた。そこで、加工過程での加熱や保存の段階でトマチン量に変化が生じるかどうか確認するため、加熱処理を行い、その経時的な量の変化を測定した。粉砕してペースト状にした未成熟トマト 10 g に対して 500 μ g のトマチンを添加し作製した試料を 4 等分してそれぞれポリプロピレン製の袋に入れ、1 袋を未加熱とし、残りの 3 袋をそれぞれ加熱温度 40°C、60°C、90°C に設定した水浴中で 30 分間加熱したのち、試験法に従って各試料中のトマチン量を測定した。その結果、図 5 に示した通り、加熱温度によるトマチン量の変化はほとんど認められなかった。

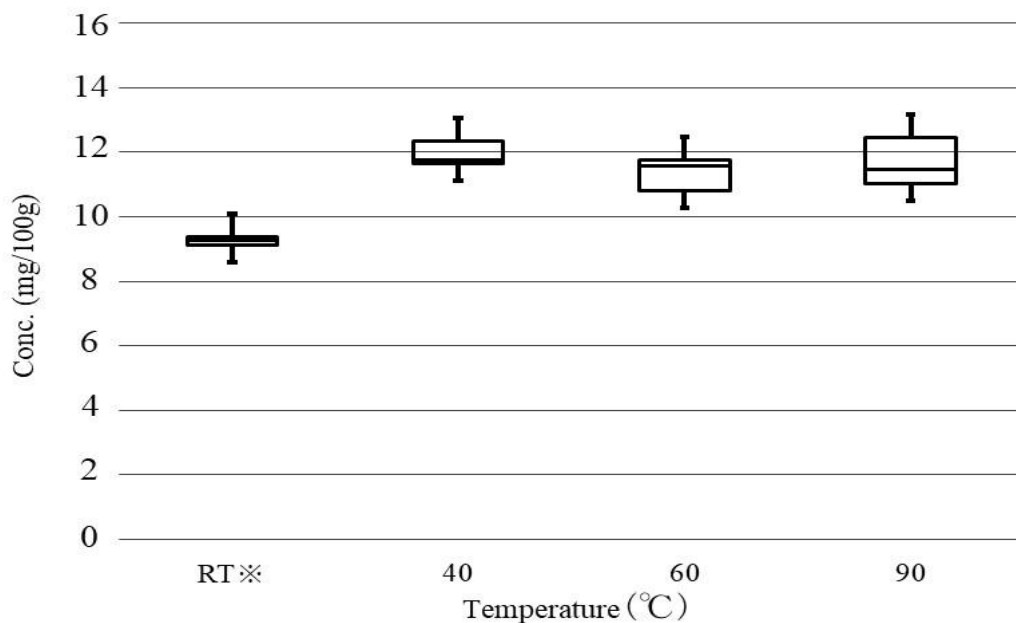


Fig. 5. Effect of temperature on concentration of tomatine

n=3 ※room temperature

次に、一定温度におけるトマチン量の経時的変化を測定した。加熱温度の実験と同様に未成熟トマト 10 g に対して 500 μg のトマチンを添加し作製した試料を 5 等分してそれぞれポリプロピレン製の袋に入れ、1 袋を未加熱とし、残りの 4 袋をそれぞれ 60°C の水浴中に 30 分、60 分、120 分、240 分間加熱したのち、各試料中のトマチン量を測定した。結果は図 6 に示す通り、加温時間によるトマチン量の変化はほとんど見受けられなかった。

今回の結果から、トマチン量は、加熱してもその定量値に影響はほとんどなかった。トマト中のトマチン量は、成熟に従い酵素によってエスクレオシド A に変換するが、今回の実験においては加熱による酵素の失活や酵素の至適温度帯であっても酵素が活性化するための時間が短いなどの理由によってトマチン量にほとんど変化がなかったと考えられた

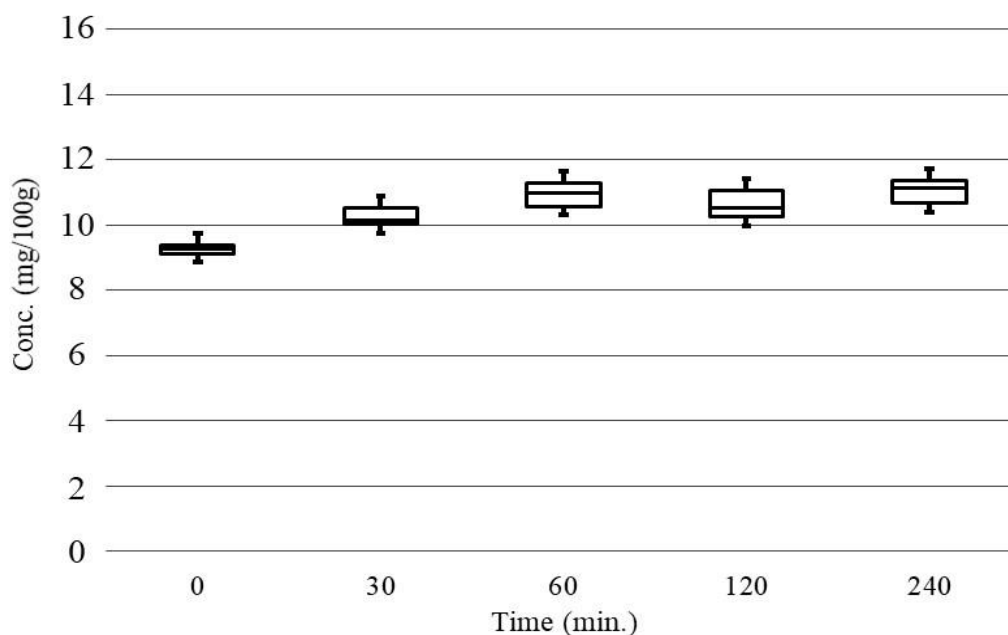


Fig. 6. Effect of heating time on concentration of tomatine

4. 小括

トマトは、民間企業が行った日本人の好きな野菜ランキング¹⁴³⁾でも1位になるほど生食のほかトマトソース、トマトケッチャップ、トマトジュースなど幅広い形態で喫食されている。しかし、未成熟のトマトには、苦み成分であるアルカロイドの一種トマチンが含まれている。トマチンは、成熟するにしたがって減少するが、完熟前のトマトを食した消費者から苦いと苦情が寄せられることがある。生鮮トマトからのトマチン分析法は、いくつか寄せ

られているが、加工品も対象とした分析法の報告は少ないことから、トマト及びその加工品に含まれるトマチンの分析法について検討した。分析法の概要は、試料を1%酢酸含有20%メタノール溶液で抽出し、OASIS HLB ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で測定する方法である。開発した分析法を生鮮トマト4種類、トマトジュース、ケッチャップなど7種類の加工品に適用した結果、添加濃度0.01 mg/kgにおける添加回収率は、生鮮トマトでは、80.3～94.8%、併行精度は1.9～5.2%、トマト加工品では76.8～95.5%、併行精度は7.3～11.6%と良好な結果が得られた。

苦情品のトマトと苦情品のトマトに近い状態で収穫したへたの周辺が青いトマトのトマチン量は、1 mg/100 g 程度であり、苦みを感じる量であった。また、生鮮トマトにトマチンを添加して加熱処理を行ったところ、加熱温度および加熱時間の違いによるトマチンの減少および変化はみられなかった。こうしたことから、加工品として使用する生鮮トマトにおいてもトマチン量を管理することは、製品管理の観点からも非常に重要であると考えられた。

結語

著者は、近年進歩の著しい LC-MS/MS を用いて、食品衛生学的な危害の発生を防止するために食品中に含まれる食品衛生上問題となる残留化学物質および有害物質について高精度で再現性の良い分析法についてその開発に携わってきた。

我々が摂取する食品は、生鮮食品から加工食品まで多岐に渡り、加工食品における加工度も煮る、焼く、蒸すなど様々な方法があり、これによって食品成分の変化が起こり、さらに、調味料や香辛料をはじめ、様々な食品添加物も添加される。このように加工食品では食品素材に由来する多くの夾雑生成が分析対象となる化合物の測定に影響を与えることになる。一方、分析法の開発にあたっては、分析精度や再現性ばかりではなく、経済性の面から一般的に汎用されている試薬、器具、機器を用いた普遍性のある分析法であることが求められる。本研究では、分析の妨害となる夾雑成分を様々なタイプのミニカラムを駆使してこのような夾雑成分を除去する方法を検討した。特に動物性食品の場合、原料由来のリン脂質やトリアシルグリセロールなどの脂質でヒトの体に有用な物質や天然色素、天然香料などの見た目や風味をよくする天然物にあっても食品分析においては測定の妨害となりうる。また、測定に高感度の LC-MS/MS を用いる場合には、こうした夾雑物質が目的成分のピーク強度を増減（イオン抑制やイオン促進）させるマトリックス効果を起こし、定量精度を低下させる原因にもなる。こうしたことから、あらかじめ機器による測定の前に前処理として液液分配やミニカラムによる固相抽出などを用いて夾雑物質をできる限り取り除くことが必要となっている。液液分配法は、ジニコナゾールおよびジルパテロールの分析法の作成で用いたが、混じりあわない2相の溶媒を使用した分配操作により目的物質と夾雑物を分離する方法である。一方、固相抽出法は、本研究のすべての分析法開発で使用しているが、ミニカラムの固定相の特性である吸着、分配、イオン交換等の分離モードを精製の目的によって応用して目的物質と夾雑物を分離する方法である。さらに、近年、LC-MS/MS の測定の場面では、フロント部に用いる HPLC の分離カラムとして新しいタイプのカラムが開発された。これは「HILIC カラム」と呼ばれ、シリカゲルなどの固定相にアミノプロピル基、アミド基、カルボキシル基などの親水性の官能基を修飾させることで、固定相表面に水和層が形成され、親水性相互作用による分配が行われる。さらに、修飾した官能基による2次的な相互作用が働くことにより、測定対象となる化学物質の物理的性質により保持が変わってくることもある。抗ウイルス剤の分析法開発においては、両性イオン官能基を修飾した ZIC-HILIC を

用いることにより、塩基性物質および両性物質の感度の良い同時分離条件を設定できた。

本研究は、上記の考え方および手法に基づき特に食品衛生上課題となっている7種の抗ウイルス剤、農薬であるジニコナゾール、動物用医薬品であるジルパテロールやアレルギー様食中毒の原因物質であるヒスタミンおよび植物アルカロイドのトマチンについて食品中からの高感度かつ簡便な分析法を確立したものである。

第1章では、鳥インフルエンザなどでその予防や治療に用いられる可能性がある抗ウイルス剤の分析法の開発について論じた。対象とした抗ウイルス剤は、海外で鶏への使用実態があるアマンタジン（商品名；シンメトレル）のほか、鶏への使用も懸念されることから人のインフルエンザ治療薬であるオセルタミビル（商品名；タミフル）、ザナミビル（商品名；リレンザ）、ペラミビル（商品名；ラピアクタ）、ラニナミビル（商品名；イナビル）や諸外国で使用実績のあるリマンタジン（商品名；フルマジン、日本では許可されていない）とウミフェノビル（商品名；アルビドール）の計7種とした。これらを試料からメタノール-水（9：1）で抽出し、強陰イオン交換体ミニカラムと強陽イオン交換体ミニカラムを用いて精製した後、分離カラムにZIC-HILICを用いたLC-MS/MSで測定する方法を確立した。これらの抗ウイルス剤のうちアマンタジン、リマンタジン、アルビドールおよびオセルタミビルは塩基性物質、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビルが両性物質と物理的性質が大きく異なるが分離カラムにZIC-HILICを用いることにより、同時分析が可能となった。確立した分析法を鶏の筋肉、脂肪、心臓などの鶏組織および鶏卵の6試料に適用した結果、真度77.9～97.5%、併行精度1.7～9.2%の良好な結果が得られた。また、焼き鳥、唐揚げなどの加工品9試料に適用した結果、真度72.6～99.2%、併行精度3.0～11.2%の良好な結果であり、鶏組織だけではなく加工品にも本分析法を適用できることが分かった。さらに、鶏の組織と鶏卵の12試料および焼き鳥、唐揚げ、サラダチキン、チキンステーキ、チキンカツなど30試料の加工品の実態調査を行ったところ、抗ウイルス剤は検出されなかった。

現時点では、今回分析対象とした抗ウイルス剤には、残留基準が設定されていないが、食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）に「抗生物質又は科学的合成品たる抗菌性物質を含有してはならない」と定められており、この条文が適用される場合、残留基準の一律基準が行政判断のレベルになると考えられる。そこで、本分析法における定量下限値は、一律

基準である 0.01 mg/kg に設定した。一方で、オセルタミビルやウミフェノビル（アルビドール）のようなプロドラッグについては、代謝物の存在が考えられることから、今後、代謝物を含む基準値の設定がなされた場合、代謝物の分解を抑えるための酸、あるいは代謝物をさらに分解して抽出や測定が行いやすい物質に変換するための酵素処理など前処理方法の採用も検討する必要があると考えられる。今回作成した分析法は前処理方法の検討にあたって有用な資料になると考える。

第 2 章では、農薬であるジニコナゾール及び動物用医薬品であるジルパテロールの分析法の開発について論じた。農薬であるジニコナゾール分析では、農産物の場合、アセトンでジニコナゾールを抽出し、*n*-ヘキサンへの転溶および脱脂後、フロリジルミニカラムおよびグラファイトカーボンミニカラムによって精製した後、LC-MS/MS で測定する方法を開発した。この分析法を玄米、ほうれん草、お茶などの農産物 8 食品に適用した結果、真度 88.3～103%、併行精度 0.5～5.1% の良好な結果が得られた。また、畜水産物の場合は、アセトン-*n*-ヘキサン混液で抽出し、脱脂後、フロリジルミニカラムによる精製を行った後、LC-MS/MS で測定する方法を開発した。この分析法を牛の筋肉、脂肪、はちみつなど畜水産物 8 食品に適用した結果、真度 102～108%、併行精度 2.0～4.9% の良好な結果が得られた。本分析法における定量限界値は、農産物及び畜水産物ともに一律基準である 0.01 mg/kg であった。本分析法は、厚生労働省によって中国産の未成熟えんどうの輸入の可否を判断する命令検査における試験法として採用され、厚生労働省より公定法（通知法）⁸³⁾ として検疫所および地方自治体等に通達された。

動物用医薬品であるジルパテロールの分析法の開発では、試料から、*n*-ヘキサン存在下のアセトニトリルで抽出し、逆相系ミニカラム、強陽イオン交換体ミニカラムによる精製を行った後、LC-MS/MS で測定する方法を作製した。この分析法を牛の筋肉、脂肪、牛乳など畜産食品 6 食品に適用したところ、真度 87.0～99.4%、併行精度 2.4～6.3% の良好な結果が得られた。本分析法における定量限界値は、一律基準である 0.01 mg/kg であった。本分析法は、厚生労働省より通知法として発出⁹⁷⁾ され、ジルパテロールの残留分析法として採用された。

第 3 章では、有害物質であるヒスタミンおよびトマチンの分析法の開発について論じた。本研究で確立したヒスタミンの分析法は、試料から 5% トリクロロ酢酸で抽出を行い、弱陽イオン交換体ミニカラムを用いて精製を行った後、LC-MS/MS にて測定する方法である。開発した分析法を養鶏や水産養

殖に用いられる 11 飼料に 5 mg/kg から 200 mg/kg となるように添加して回収試験を行ったところ、真度 79.6~116%、併行精度 1.9~10.3%の良好な結果が得られた。本分析法における定量限界値は、5 mg/kg であった。また、食品への応用を試みたところ、真度、精度ともに良好な結果であり、食品分野への応用も可能であることが示唆された。こうしたことは、ヒスタミン食中毒が発生した際に、簡便に短時間で原因究明が行うことができ、食品衛生学的にも大変有意義な方法であると考えられた。なお、本分析法は飼料分析法の改定にあたって新規に開発した分析法であり、平成 30 年 6 月 6 日に従来キャピラリー電気泳動法および比色法と比較して、簡便で感度および精度の極めて高い分析法であると評価され、公定法である飼料分析基準¹¹⁾のヒスタミン分析法として採用された。

トマトが苦いという苦情の原因物質であるトマチンについて分析法を開発した。今回、確立した分析法は、試料から 1%酢酸含有 20%メタノール溶液を用いてトマチンを抽出後、ポリマー系ミニカラムを用いて精製を行い、LC-MS/MSにて測定する方法である。開発した分析法を 4 種類の生鮮トマトおよびトマトケッチャップ、カットトマトなどのトマト加工品 7 食品に適用したところ、生鮮トマトで、真度 80.3~94.8%、併行精度は 1.9~5.2%であった。また、トマト加工品では 76.8~95.5%、併行精度は 7.3~11.6%と良好な結果が得られた。本法の定量限界は 0.01 mg/100 g であった。本法を用いて苦情品のヘタの周りが青いトマトを分析したところ、1.04 mg/100 g および 1.54 mg/100 g のトマチンが検出され、これはトマトを栽培して完熟前の状態で採取したトマト同じような状態で採取したトマトのトマチン含有量 1.10 mg/100 g と同程度であり、苦みの官能検査と合わせ、トマチンの量が低濃度でも苦みを感じることを確認した。また、本法は、生鮮トマトだけではなく、ケッチャップ、トマトソース、野菜ジュース、飴など幅広いトマト加工品にも応用することができた。また、加熱によるトマチンの消長についても実験を行い、加熱処理後もトマチン含量が減少しないことを見出した。このことは、加工に用いられる原料のトマトに含有されるトマチン量を経時的に管理する必要があることが分かったことから、食品衛生上大きな知見であると考えられる。

今後の展望

我々の身の回りには、多くの化学合成品が存在しており、食品の生産から製造、加工の各工程においては、各種の食品添加物、農薬、動物用医薬品などが、また容器包装などではプラスチック製品が食品の包装、輸送、保存に利用されている。これらは、安定した食料供給や生活環境をより良いものに

している一方で、農薬の過量使用によって土地がやせ、耕作が行えなくなったり、耕作地開発のために山林が伐採されるなど、環境に大きな変化をもたらしている現状もある。また近年は、プラスチック製品の多用により、マイクロプラスチックによる環境問題が指摘されている。こうした中、2015年9月に持続可能な開発目標（SDGs：Sustainable Development Goals）¹⁴¹⁾が、国連サミットで加盟国の全会一致で採択された。2030年までに達成すべき17の国際目標が掲げられている。本研究は、この20年余りで大きく進歩したLC-MS/MSを用いて感度、選択性の向上を図り、少ない試料と少ない有機溶媒で抽出し、短時間で正確な分析を目指したものであり、有害化学物質の摂取の減少（3. すべての人に健康と福祉を）、環境生態系の保護（6. 安全な水とトイレを世界に）にも繋がることから、SDGsの考えと一致するものと考えらる。

食品中の残留化学物質の分析法は、農薬や動物用医薬品の適正な使用が遵守されているかの確認手段として重要な役割を果たしており、食品分析に求められる意義、重要性は以前に増して高まっている。本研究における残留化学物質は、非常に低濃度でも人の身体に悪影響を及ぼすことがあり、その残留濃度を正確に測定することは食品の安全性確保において大変重要なことであると考えらる。食品分析に携わる分析者として今後も多くの課題に真摯に向き合い、環境への配慮を忘れることなく新しい分析技術の開発を通して食品衛生に寄与していきたいと考えている。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始御懇篤なるご指導を頂いた上、博士論文学位取得に関わる諸手続きを行っていただきました帝京科学大学 松岡 浩教授に深甚なる謝意を表します。

帝京科学大学 高谷 光教授、岩瀬礼子教授、佐野友彦教授、東 克己教授には、学位論文の副査をお務め頂いただき、研究に関して貴重なご指導を頂きました。ここに心より感謝の意を表します。

また、本稿作成にあたり、貴重なご助言と御校閲を頂きました一般財団法人東京顕微鏡院 安田和男博士ならびに中里光男博士に謝意を表します。

また、本研究をまとめるにあたり、終始御激励とご助言をいただきました小島尚博士、堂ヶ崎知格博士に深く感謝いたします。

さらに、本研究を進めるにあたり、様々なご協力と御理解を頂きました一般財団法人東京顕微鏡院 高橋利之副理事長、宮田昌弘所長および理化学検査部職員の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、終始にわたり多大なる理解と協力をいただき、精神的に大きく支えてくれた家族に深い感謝の意を表して謝辞といたします。

参考文献

- 1) 厚生労働省ホームページ 厚生労働白書
https://www.mhlw.go.jp/toukei_hakusho/hakusho/index.html (20220404 閲覧)
- 2) Expert Committee on Environmental Sanitation fourth report. Woeld Health Organization 17. (1955)
- 3) 農林水産省ホームページ 日本の食料自給率
https://www.maff.go.jp/j/zyukyu/zikyu_ritu/012.html (20220404 閲覧)
- 4) State of world population 2022 (世界人口白書) 132-136
- 4) 大島 正弘, 廣瀬 咲子, 川岸 万紀子, 川口 健太郎, 安倍 史高, 藤郷 誠, 西澤 けいと, わが国における遺伝子組み換え作物開発の現状と今後の課題, 特許庁技術懇話会, 262, 7-19
- 5) 近藤 一成, 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) 「新たなバイオテクノロジーを用いて得られた食品の安全性確保とリスクコミュニケーションのための研究」 総合総括研究報告書
- 6) Yamamoto, K., Kugimiya, W., Maeda, Y., Yano, H., Kusumoto, K., Nabetani, H., Trends in plant-based substitutes for animal proteins. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology, 67(12), 459-473(2020)
- 7) Datar, I., Betti, M. Possibilities for an in vitro meat production system. INNOV FOOD SCI. EMERG. TECHNOL. 11(1), 13-22(2010)
- 8) オオニシ タクヤ, 動物性タンパク質源である昆虫食のエネルギー的可能性 その量産を目雑デザイン手法, KEIO SFC JOURNAL, 17(1), 186-207(2017)
- 9) Thinking about the future of food safety a foresight report. Food and Agriculture Organization of the United Nations, (2002)
- 10) 農林水産省ホームページ 食品ロス量 (令和元年度推計値)
<https://www.maff.go.jp/j/press/shokuhin/recycle/211130.html> (20220404 閲覧)
- 11) 農林水産省ホームページ フードループ取り組み 17 の目標と食品産業とのつながり
https://www.maff.go.jp/j/shokusan/sdgs/goal_12.html (20220404 閲覧)
- 12) 石川敏夫, 高野研一, 食品安全の信頼と偽装機会, 安全工学, 49(4), 225-232 (2010)
- 13) 平成 17 年度食品安全確保総合調査 国内で発生した事故・事例を対象として食品安全に係る情報の収集と提供に関する調査報告書, 内閣府食品安全委員会

- 14) 「水俣病に関する社会科学的研究会」報告書 水俣病の悲劇を繰り返さないために ―水俣病の経験から学ぶもの― 平成 11 年 12 月 水俣病に関する社会科学的研究会, 国立水俣病総合研究センター
- 15) 厚生労働省ホームページ 食中毒統計資料
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html (20220404 閲覧)
- 16) 村上洋介, 口蹄疫ウイルスと口蹄疫の病性について, 日獣会誌, 5(5), 257-277(2000)
- 17) 厚生労働省ホームページ 鳥インフルエンザ A (H5N1) について
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000144523.html>
(20220404 閲覧)
- 18) 厚生労働省ホームページ 鳥インフルエンザ A (H7N9) について
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000144470.html>
(20220404 閲覧)
- 19) 馬場昌範, 抗ウイルス薬研究の歩み, ウイルス, 55(1), 69-76(2005)
- 20) 厚生労働省ホームページ 令和 2 年度における輸入食品監視指導計画に基づく監視指導結果 (20220404 閲覧)
<https://www.mhlw.go.jp/content/11135200/000824506.pdf>
- 21) 厚生労働省ホームページ 告示法
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/zanryu/591228-1.html (20220404 閲覧)
- 22) 厚生労働省ホームページ 通知法
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/zanryu/zanryu3/siken.html (20220404 閲覧)
- 23) 食品衛生検査指針 動物用医薬品・飼料添加物編 2003 社団法人日本食品衛生協会
- 24) 食品衛生検査指針 残留農薬編 2003 社団法人日本食品衛生協会
- 25) 衛生試験法・注解 2020 公益社団法人日本薬学会
- 26) Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. J. AOAC Int. 90(2), 485-520(2007)
- 27) Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and Liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. Anal. Bioanal. Chem. 389, 1697-1714(2007)
- 28) 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の一部改正について (平成 22 年 12 月 24 日 食安発 1224 第 1 号)

- <https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/dl/101224-1.pdf> (令和4年4月4日閲覧)
- 29) 食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて
(平成20年9月26日 食安発0926001号) (令和4年4月4日閲覧)
https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tb4700&dataType=1&pageNo=1
- 30) 浅野正博, 城田浩治, 阿南豊正, 山庄司志朗, 一色賢司. バイオアッセイによるトマト中のトマチンの測定., 日本食品化学工学会誌, 43(3), 275-280(1996)
- 31) 新藤哲也, 牛山博文, 観公子, 安田和男, 斎藤和夫. ジャガイモ中の α -ソラニン, α -チャコニン含有量及び貯蔵中の経時変化., 日本食品衛生学会誌, 45(3), 272-282(2004)
- 32) 粟飯原景昭. マイコトキシンについてアフラトキシンを中心に(II)., 日本中医師会雑誌, 33(6), 259-264(1980)
- 33) 山木将悟, 山崎浩司. 水産物におけるヒスタミン食中毒とヒスタミン生成菌., 日本食品微生物学会雑誌, 36(2), 75-83(2019)
- 34) 平成20年4月1日 19消安第14729号 農林水産省消費・安全局通知 飼料分析基準, 第7章, 有害物質, 5. ヒスタミン 402-405
- 35) 能勢憲英, 菊池好則, 山田文子, 渡辺昭宣. ガスクロマトグラフィーによる畜産食品中の残留サルファール剤の分析. 日本食品衛生学会誌, 20(2), 115-119(1979)
- 36) Takatsuki, K., Kikuchi, T. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of six sulfonamide residues in egg and animal tissues. J AOAC Int. 6, 886-892(1990)
- 37) 畜水産食品の薬物残留とその分析法 (財)畜産生物化学安全研究所
- 38) 厚生省環境衛生局食肉衛生課 畜水産食品中の残留物質検査法 第1集 (1977)
- 39) 厚生省環境衛生局食肉衛生課 畜水産食品中の残留物質検査法 第1集の2(1979)
- 40) 厚生省環境衛生局食肉衛生課 畜水産食品中の残留物質検査法 第1集の3(1981)
- 41) 厚生省環境衛生局食肉衛生課 畜水産食品中の残留物質検査法 第1集の4(1982)
- 42) 厚生省環境衛生局食肉衛生課 畜水産食品中の残留物質検査法 第1集の5(1983)
- 43) 堀江正一, 斎藤貢一, 星野庸二, 能勢憲英, 浜田尚樹, 中沢裕之. フォトダイオードアレイ検出高速液体クロマトグラフィーによる食中の残留サ

- ルファ剤の一斉分析., 日本食品衛生学会誌, 31(2), 171-176(1990)
- 44) 山本雄三, 橋口玲子, 荒木桂子, 串間泰文. 高速液体クロマトグラフィーによる鶏肉中のハロフジノンの簡易定量法., 日本食品衛生学会誌, 32(5), 444-447(1991)
- 45) 堀江正一, 斎藤貢一, 能勢憲英, 中沢裕之. 高速液体クロマトグラフィーによる食肉中のエンロフロキサシンの定量., 日本食品衛生学会誌, 34(4), 289-293(1993)
- 46) 門田実, 今中雅章, 小川登, 熊城一男, 森忠繁, 岡尚男, 猪飼誉友, 堀江正一, 鈴木澄子, 中澤裕之. 高速液体クロマトグラフィーによる鶏肉中のアボパルシンの分析., 日本食品衛生学会誌, 35(1), 23-27(1994)
- 47) 佐野明, 中村洋. 分離基材の最近の進歩., 分析化学, 56(5), 279-297(2007)
- 48) 池上亨, 田窪宏貴, 田中信男. 親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)ー開発の背景, および分離モードの特徴, クロマトグラフィー. 化学学会誌., 29(2), 1-6(2008)
- 49) 秋山由美, 武田信幸, 足立一彦. 農産物中カーバメイト系農薬の沈殿法による精製及びベンジル誘導体化 GC/MS による分析法の検討., 日本食品衛生学会誌, 36(1), 42-49(1995)
- 50) 堀江正一, 吉田栄充, 菊池好則, 中澤裕之. LC/MS による食肉中のストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンの定量., 日本食品衛生学会誌, 42(6), 374-378(2001)
- 51) Cherlet, M., De Baere, S., De Backer, P. Quantitative determination of dihydrostreptomycin in bovine tissues and milk by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 42, 647-656 (2007)
- 52) 日本経済新聞, 「山中破ったネリ、ドーピング検査で陽性反応 WBC 発表」, 2017年8月24日 (令和4年4月4日閲覧)
https://www.nikkei.com/article/DGXLSSXK40184_U7A820C1000000/
- 53) 農林水産大臣公表 (令和2年7月1日) Specific Domestic Animal Infectious Disease Quarantine Guidelines for Highly Pathogenic Avian Influenza and Low Pathogenic Avian Influenza
https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/katiku_yobo/k_bousi/attach/pdf/index-30.pdf (令和4年4月4日閲覧)
- 54) Tsuji, K., Iwasaki, J., Imamura, Y., Yoshimoto, S., Kajiwara, J., Ishibashi, T., Mori, R., Yamada, T., Toyoda, T. Emergence of amantadine-resistant influenza A viruses. *VIRUS*, 51, 135-141(2001)

- 55) Ozawa, Y. Global situation of avian influenza and its new countermeasures. *Modern media*, 52, 335-342(2006)
- 56) Parry, J. Use of antiviral drug in poultry is blamed for drug resistant strains of avian flu. *BMJ*, 331, 10(2005)
- 57) Kaminaka, K., Nozaki, C. Prevention and Treatment of Influenza. *J. Kumamoto Health Science University*, 16, 1-9(2019)
- 58) Cyranoski, D. China's chicken farmers under fire for antiviral abuse. *Nature*, 435, 1009(2005)
- 59) Wu, Y.L., Chen, R.X., Xue, Y., Yang, T., Zhao, J., Zhu, Y. Simultaneous determination of amantadine, rimantadine and memantine in chicken muscle using multiwalled carbon nanotubes as a reversed-dispersive solid phase extraction sorbent. *J. Chromatogr. B*, 965, 197-205 (2014).
- 60) Twabela, A., Okamatsu, M., Matsuno, K., Isoda, N., Sakoda, Y. Evaluation of baloxavir marboxil and peramivir for the Treatment of High Pathogenicity Avian Influenza in Chickens. *Viruses*, 12, 1407-1419(2020)
- 61) Allen, G.D., Brookes, S.T., Barrow, A., Dunn, J.A., Grosse, C.M. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the determination of the neuraminidase inhibitor zanamivir (GG167) in human serum. *J. Chromatogr. B*, 732, 383-393(1999).
- 62) Bahrami, G., Mohammadi, B., Kiani, A. Determination of oseltamivir carboxylic acid in human serum by solid phase extraction and high performance liquid chromatography with UV detection. *J. Chromatogr. B*, 864, 38-42(2008).
- 63) Lindegardh, N., Hanpithakpong, W., Wattagoon, Y., Singhasivanon, P., White, N.J., Day, N.P.J. Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for determination of oseltamivir and its metabolite oseltamivir carboxylate in plasma, saliva and urine. *J. Chromatogr. B*, 859, 74-83(2007).
- 64) Liu, Y., Xu, C., Yan, R., Lim, C., Yeh, L.T., Lin, C.C. Sensitive and specific LC-MS/MS method for the simultaneous measurements of viraclidine and ribavirin in human plasma. *J. Chromatogr. B*, 832, 17-23(2006)
- 65) Heinig, K., Bucheli, F. Sensitive determination of oseltamivir and oseltamivir carbokylate in plasma, urine, cerebrospinal fluid and brain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 876, 129-136(2008).
- 66) Sioufi, A., Pommier, F. Gas chromatographic determination of amantadine hydrochloride in human plasma and urine. *J. chromatography B*, 183, 33-

39(1980).

- 67) Baughman, T.M., Wright, A.L., Hutton, K.A. Determination of zanamivir in rat and monkey plasma by positive ion hydrophilic interaction chromatography (HILIC)/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 852, 505-511(2007).
- 68) David, J.S., Geoffrey, L., Alison, M.B., Willard, L., Ke-Yu, W., Kenneth, C.C. Metabolism of the influenza neuraminidase inhibitor prodrug oseltamivir in the Rat. *DRUG METABOLISM & DISPOSITION*, 28, 737-741(2000).
- 69) Ohura, K., Tasaka, K., Hashimoto, M., Imai, T. Distinct Patterns of Aging Effects on the Expression and Activity of Carboxylesterases in Rat Liver and Intestine. *Drug Metab Dispos*, 42, 264-273(2014).
- 70) Chan, D., Tarbin, J., Sharman, M., Carson, M., Smith, M., Smith, S. Screening method for the analysis of antiviral drugs in poultry tissues using zwitterionic hydrophilic liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 700, 194-200 (2011).
- 71) Tsuruoka, Y., Nakajima, T., Hashimoto, T., Kanda, M., Hayashi, H., Matsushima, Y., Yoshikawa, S., Nagano, C., Okutomi, Y., Takano, I. Determination of amantadine in poultry tissues and egg by LC-MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, 56(3), 83-87(2015).
- 72) Berendsen, B. J. A., Wegh, R. S., Essers, M. L., Stolker, A. A. M., Weigel, S. Quantitative trace analysis of a broad range antiviral drugs in poultry muscle using column-switch liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal chem*, 402, 1611-1623(2012).
- 73) Tsuruoka, Y., Nakajima, T., Kanda, M., Hayashi, H., Matsushima, Y., Yoshikawa, S., Nagata, M., Koike, H., Nagano, C., Sekimura, K., Hashimoto, T., Takano, I., Shindo, T. Simultaneous determination of amantadine, rimantadine, and memantine in processed products, chicken tissues, and eggs by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 1044-1045, 142-148(2017).
- 74) Zhao, S., Li, D., Qiu, J., Wang, M., Yang, S., Chen, D. Simultaneous determination of amantadine, rimantadine and chlorpheniramine in animal-derived food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry after fast sample preparation. *J. Chromatogr. B*, 17, 1044-1045(2014).
- 75) Wang, Z., Wang, X., Wang, Y., Wu, C., Zhou, J. Simultaneous determination of five antiviral drug residues and stability studies in honey using a two-step fraction capture coupled to liquid chromatography tandem mass

- spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1638, 461890 (2021).
- 76) Yan, H., Liu, X., Cui, F., Yun, H., Li, J., Ding, S., Yang, D., Zhang, Z. Determination of amantadine and rimantadine in chicken muscle by QuEChERS pretreatment method and UHPLC coupled with LTQ Orbitrap mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 938, 8-13(2013).
- 77) Turnipseed, S.B., Storey, J.M., Andersen, W.C., Filigenzi, M.S., Heise, A.S., Lohne, J.J., Madson, M.R., Ceric, O., Reimschuessel, R. Determination and confirmation of the antiviral drug amantadine and its analogues in chicken jerky pet treats. *J. Agric Food Chem*, 31, 6968-6978(2015).
- 78) Liu, Z., Yang, F., Yao, M., Lin, Y., Su, Z. Simultaneous determination of antiviral drugs in chicken tissues by ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Sep Sci*, 38, 1748-1793 (2015).
- 79) 厚生労働省報道発表資料 輸入食品に対する検査命令の実施 ～韓国産 エゴマ、その加工品～ (令和4年4月4日閲覧)
<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000037971.html>
- 80) Suto, S., Otsuka, K., Tomizawa, S., Tamura, Y., Yamaki, Y., Masubuchi, T., Iwakoshi, K., Nakagawa, Y., Masuda, R., Kokaji, Y., Takano, I., Shindo, T. Survey of pesticide residues in imported crops(vegetables and other products)(April 2014-March 2015). *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, 66, 197-204(2015)
- 81) Tonogai, Y., Tsumura, Y., Nakamura, Y., Ito, Y., Miyata, M., Kamakura, K., Hasegawa, M., Wada, I., Fujiwara, Y. Development of simultaneous analysis for 8 kinds of organonitrogen fungicides in vegetables and fruits by FTD-GC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi(J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 34, 216-226(1993).
- 82) Amer, M.M., Shehata, M.A., Lotfy, H.M., Monir, H.H. Determination of tetraconazole and diniconazole fungicide residues in tomatoes and green beans by capillary gas chromatography. *YAKUGAKU ZASSHI*, 127, 993-999(2007).
- 83) Bicchi, C., Cordero, C., Rubiolo, P., Occelli, A. Simultaneous determination of six triazolic pesticide residues in apple and pear pulps by liquid chromatography with ultraviolet diode array detection. *J. AOAC Int.*, 84, 1543-1550 (2001).
- 84) Schermerhorn, P.G., Golden, P.E., Krynitsky, A.J., Leimkuehler, W.M. Determination of 22 triazole compounds including parent fungicides and metabolites in apples, peaches flour, and water by liquid chromatography/

- tandem mass spectrometry. J. AOAC Int., 88, 1491-1502 (2005).
- 85) M. J., Bernal J. L., Jimenez J. J., Martin M. T., Bernal J. Determination of azolic fungicides in wine by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 1076, 90-96 (2005).
- 86) 食品に残留する農薬、飼料添加物または動物用医薬品の成分である物質の試験法の一部改正について (平成 26 年 11 月 26 日 食安発 1126 第 1 号)
<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzendu/0000066461.pdf> (令和 4 年 4 月 4 日閲覧)
- 87) 食品安全委員会、食品安全総合情報システム、台湾衛生福利部食品薬物管理署、米国産牛肉からジルパテロールが検出されたとのメディア報道について説明 (2013 年 10 月 29 日) (令和 4 年 4 月 4 日閲覧)
<http://www.fsc.go.jp/fsciis/foodSafetyMaterial/show/syu03910300493>
- 88) 食品安全委員会、食品安全総合情報システム、台湾行政院衛生署、市場販売されている輸入牛肉及び国産ガチョウ肉から β -アゴニストが検出された旨公表 (2011 年 1 月 20 日) (令和 4 年 4 月 4 日閲覧)
<http://www.fsc.go.jp/fsciis/foodSafetyMaterial/show/syu03290520361>
- 89) 内閣府 食品安全委員会 動物用医薬品 リスク評価結果 (平成 25 年 1 月 28 日 府食第 66 号) (令和 4 年 4 月 4 日閲覧)
<http://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya20120326438>
- 90) 食品衛生法施行規則の一部を改正する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について(平成 26 年 08 月 08 日、食安発 0 8 0 8 第 1 号)
<http://www.jhnfa.org/tokuhou248.pdf> (令和 4 年 4 月 4 日閲覧)
- 91) Shelver, W. L., and Smith, D. J. Enzyme-linked immunosorbent assay development for the β -adrenergic agonist zilpaterol. J. Agric. Food Chem., 52, 2159-2166(2004).
- 92) Shelver, W. L., and Smith, D. J. Immunochemical-based zilpaterol measurement and validation in urine and tissues. Food and Agricultural Immunology, 22, 247-258(2011).
- 93) Shelver, W.L., Keum, Y.S, Li, Q.X., Fodey, T.L., Elliott, C.T. Development of an immunobiosensor assay for the beta-adrenergic compound zilpaterol. Food and agricultural immunology, 16, 199-211(2005)
- 94) Bocca, B., Di Mattia, M., Cartoni, C., Fiori, M., Felli, M., Neri, B., Brambilla, G. Extraction, clean-up and gas chromatography-mass spectrometry characterization of zilpaterol as feed additive in fattening cattle. J.

- Chromatogr. B Analyt Technol Biomed Life Sci., 783, 141-149(2003).
- 95) Bocca, B., Fiori, M., Cartoni, C., Brambilla, G. Simultaneous Determination of zilpaterol and other Beta agonists in calf eye by gas chromatography/tandem mass spectrometry. J. AOAC Int., 86, 8-14(2003)
- 96) Blanca, J., Munoz, P., Morgado, M., Mendez, N., Aranda, A., Reuvers, T., Hooghuis, H. Determination of clenbuterol, ractopamine and Zilpaterol in liver and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry, Analytica Chimica Acta, 529, 199-205(2005).
- 97) Van Hoof, N., Schilt, R., Vlis, E. V., Boshuis, P., Baak, M. V., Draaijer, A., Wasch, K. D., Wiele, M., Henheyn, D., Brabander, H. Detection of Zilpaterol (Zilmax®) in calf urine and faeces with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, 529, 189-197(2005)
- 98) Kim, J. Y., Chae, Y. S., Moon, J. H., Baek, S. H. Establishment of a Method for Analyzing the Zilpaterol Residue in Beef Using Tandem Mass Spectrometry, Food Science and Technology Research, 20, 1165-1171(2014).
- 99) Molognoni, L., de Souza, N. C., de Sa Ploencio, L. A., Micke, A., Daguer, H. Simultaneous analysis of spectinomycin, halquinol, zilpaterol, and melamine in feedingstuffs by ion-pair liquid chromatography—tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 1569, 110-117(2018).
- 100) 食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法の一部改正について(平成 28 年 04 月 04 日、生食発 0 4 0 4 第 5 号)
<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzendu/0000164941.pdf> (令和 4 年 4 月 4 日閲覧)
- 101) 食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 第 1 章総則 3. 試薬・試液
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/zanryu/zanryu3/siken.html (令和 4 年 4 月 4 日閲覧)
- 102) Ibe, A. Biogenic amines in fermented foods. Toyoto Kenko Anzen Kenkyu Senta Kenkyu Nempo (Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health), 55, 13-22(2004)
- 103) Toda, M., Yamamoto, M., Uneyama, C., Morikawa, K. Histamine food poisonings in japan and other countries. Bull. Natl. Inst. Health Ssi., 127, 31-38(2009)
- 104) 食品安全委員会 ファクトシート (ヒスタミン)
<https://www.fsc.go.jp> (令和 4 年 4 月 4 日閲覧)

- 105) Horaguchi, H., Masumura, T., Horikawa, H., Sugahara, M. Gizzard erosion and ulceration in broiler chicks, 2. Effect meal. *Japan. Poult. Sci.*, 17, 351-37(1980)
- 106) Masumura, T., Horaguchi, H., Horikawa, H., Sugahara, M. Gizzard erosion and ulceration in broilers, 3. Toxic substance in fish meal. *Japan. Poult. Sci.*, 18, 98-104(1981)
- 107) Yonekura, M., Suzuki, S., Nakaya, T. Influence of ascorbic acid supplementation on the toxic effects of dietary histamine in chicks. *Japan. Poult. Sci.*, 24, 354-362(1987)
- 108) Otake, S., Maeda, T., Fukui, K. Biological investigation on the metabolism of histamine in mackerel (*Scomber japonicas*)-1, Influence of histamine injection into stomach on the breakdown of tissues. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 43, 477-488(1977)
- 109) 試料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC) ホームページ (令和4年4月4日閲覧) http://www.famic.go.jp/ffis/feed/hourei/sub1_houritu.html
- 110) 平成30年6月29日 30消安第1549号 農林水産省消費・安全局通知: 飼料分析基準の一部改正について (令和4年4月4日閲覧)
- 111) 食品衛生検査指針 理化学編 2015, 公益社団法人日本食品衛生協会 784-795.(ISBN978-4-88925-071-8)
- 112) Ibe, A., Saito, K., Nakazato, M., Kikuchi, Y., Fujinuma, K., Nishima, T. Quantitative determination of amines in wine by liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, 74, 695-698(1991)
- 113) Nakazato, M., Saito, K., Morozumi, S., Wauke, T., Ishikawa, F., Fujinuma, K., Moriyasu, T., Nishima, T., Tamura, Y. Determination of putrefactive non-volatile amines in foods following sample cleanup by solid phase extraction. *Eisei Kagaku (Jpn. J. Toxicol. Environ. Health)*, 40, 203-209(1994)
- 114) Awazu, K., Nomura, C., Yamaguchi, M., Obana, H. Determination of histamine in fish and fish products by tandem solid-phase extraction. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, 52, 199-204(2011).
http://www.famic.go.jp/ffis/feed/tuti/30_1549.html
- 115) Kikuchi, H., Tsutsumi, T., Matsuda, R. Performance evaluation of a fluorescamine-HPLC method for determination of histamine in fish and fish products. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, 53, 121-127(2012)
- 116) Yamanaka, H., Matsumoto, M. Simultaneous determination of polyamines in red meat fishes by performance liquid chromatography and evaluation of freshness. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, 30, 396-400(1989)

- 117) Saito, K., Horie, M., Nakzawa, H. Determination of amines in foods by HPLC using on-column derivatization with automated sample clean-up. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, 36, 639-642(1995)
- 118) Otsuki, F., Koeduka, K., Hayashi, T., Yamamoto, J. Studies on simultaneous determination of nonvolatile amines by LC/MS/MS. 岡山県環境保健センター年報 (Annual Report of Okayama Prefectural Institute for Environmental Science and Public Health), 34, 99-103(2010)
- 119) Kakigi, Y., Yamashita, A., Miyamoto, Y., Icho, T., Mochizuki, N. Quantification of non-volatile amines in beer using hydrophilic interaction liquid chromatograph-tandem mass spectrometer. *Bunseki Kagaku*, 60, 157-162(2011)
- 120) Shoji, M., Okuma, N., Chiba, Y., Okura, Y. Examination of the quick analysis method on histamine. 宮城県保健環境センター年報 (Annual Report of Miyagi Prefectural Institute of Public Health and Environment), 31, 61-64(2013)
- 121) Nishina, T., Tobino, T., Ukaji, N., Hamamoto, A., Matsumoto, R., Masunaga, M., Noda, K., Murakawa, H. Simultaneous determination of nonvolatile amines in foods by LC/MS/MS. 熊本県保健環境科学研究所報 (Annual Report of Kumamoto Prefectural Institute of Public-Health and Environmental Science), 44, 13-16(2014)
- 122) Sato, Y., Ota, K., Kasahara, Y. Studies on simultaneous analysis of non-volatile amines by LC-MS/MS. *山形衛研所報*, 48, 13-16(2015)
- 123) 杉田浩一, 平 宏和, 田島 眞, 安井明美. 日本食品大辞典, p159-161, 医歯薬出版(2008)
- 124) 農林水産省品種登録ホームページ
<http://www.hinshu2.maff.go.jp/index.html> (令和4年4月4日閲覧)
- 125) Giovannucci, E., Ascherio, A., Rimm E. B., Stampfer, M J., Colditz, G. A., Willett, W. C Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.*, 87(23), 1767-1776(1995)
- 126) Inakuma, T. Study of Carotenoid Activity in Vegetables. Application to Food Development. *Nippon. Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 62(6), 263-273(2015)
- 127) Yakabe, T., Miyashita, T., Yoshida, K., Inakuma, T. The potency of carotenoids found in vegetables and fruits. *Folia Pharmacol. Jpm.* 141, 263-273(2015)
- 128) 東京都衛生局生活環境部食品保健課編. 食品の苦情 Q&A (追録版), 346-348, 東京都政策報道室都民の声部情報公開課, 東京都(1999)
- 129) Kasuya, Y., Matsumoto, H., Matsuda, T., Nakazato, M., Matsushita, S.,

- Wauke, T., Fujikawa, H., Yasuda, K. Some consumer complaints related to food products in Tama area, Tokyo(III). Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst P. H., 55, 193-197(2004)
- 130) 萩原清和. 食品の苦味成分. 調理科学, 13(1), 21-26(1980)
- 131) Roddick, J. G. The acetylcholinesterase-inhibitory activity of steroidal glycoalkaloids and their aglycones, *Phytochemistry*, 28(10), 2631-2634(1989)
- 132) Furui, H., Inakuma, T., Ishiguro, Y., Kiso, M. Absorptiometric measurement of tomatine in tomatoes. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 71(8), 777-782(1997)
- 133) Asano, M., Shirota, K., Anan, T., Yamashoji, S., Isshiki, K. Measurement of tomatine content in tomatoes with bioassay procedure. *Nippon Shokuhin Kagaku Kougaku Kaishi*. 43(3), 275-280(1996)
- 134) Keukens, E. A. J., Hop, M. E. C. M., Jongen, W. M. F. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantification of tomatine in tomato. *J. Agric. Food Chem.*, 42(11), 2475-2477(1994)
- 135) Takagi, K., Toyoda, M., Shimizu, M., Satoh, T., Saito, Y. Determination of tomatine in foods by liquid chromatography after derivatization. *J. Chromatogr. A.*, 659, 127-131(1994)
- 136) Bushway, R. J., Perkina, L. B., Paradis, L. R., Vanderpan, S. High-performance liquid chromatographic determination of the tomato glycoalkaloid, tomatine, in green and red tomatoes. *J. Agric. Food Chem.*, 42(12), 2824-2829(1994)
- 137) Friedman, M. Levin, C. E. α -Tomatine content in tomato and tomato products determined by HPLC with pulsed amperometric detection. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1507-1511(1995)
- 138) Meher, H. C., Gaur, H. S. A new UV-LC method for estimation of α -tomatine and α -solanine in tomato. *Indian J. Nematol.*, 33(1), 24-28(2003)
- 139) Cataldi, T. R. I., Lelario, F., Bufo, S. A. Analysis of tomato glycoalkaloids by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 3103-3110(2005)
- 140) Koh, E., Kffka, S., Mitchell, A. E. A long-term comparison of the influence of organic and conventional crop management practices on the content of the glycoalkaloid α -tomatine in tomatoes. *J. Sci. Food Agric.*, 93(7), 1537-1542(2013)
- 141) Dzakovich, M. P., Hartman, J. L., Cooperstone, J. L. A high-throughput extraction and analysis method for steroidal glycoalkaloids in tomato. *Front. Plant Sci.* 11, 767(2020)

- 142) Ciara, D. A., Cludia, F., Gianni, G., Stefano. S., Arnaldo. D., Rosangela, M. A
multiresidual method for the simultaneous determination of the main
glycoalkaloids tomato (Solnum lycopersicum L.) by LC-DAD-MS/MS. J. Sep. Sci.,
32, 3664-3671(2009)
- 143) タキイ種苗株式会社 ホームページ「2021年度 野菜と家庭菜園に関する調査」 (令和4年4月4日閲覧)
https://www.takii.co.jp/info/news_210819.html
- 144) 外務省 ホームページ JAPAN SDGs Action platform
<https://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/oda/sdgs/index.html>
(令和4年4月4日閲覧)

主論文

1. Takayuki ASAKURA, Mariko KITAMURA, Miho YASUMOTO, Yoshitaka TAKEUCHI, Mitsuo NAKAZATO, Kazuo YASUDA. Simultaneous analysis of 7 antiviral agents in chicken tissues and its processed products by LC-MS/MS .,Food Hyg. Saf. Sci. 63(1), 1-11(2022) (英文)
2. 朝倉敬行, 北村真理子, 関 亘, 飯田智成, 中里光男, 安田和男, 根本 了., LC-MS/MS による農産物および畜水産物中のジニコナゾールの分析法, 食品衛生学雑誌, 58(4), 195-200(2017)
3. 朝倉敬行, 北村真理子, 石川孝明, 飯田智成, 中里光男, 安田和男, 根本了., LC-MS/MS による畜水産物中のジルパテロールの分析法, 食品衛生学雑誌, 60(5), 127-133(2018)
4. 朝倉敬行, 北村真理子, 寶龍久枝, 中里光男, 安田和男., LC-MS/MS による魚粉中のヒスタミンの分析法. 日本食品化学学会誌, 25(2), 86-91(2018)
5. 朝倉敬行, 石川孝明, 飯田智成, 中里光男, 安田和男., LC-MS/MS を用いた生鮮トマト及びトマト加工品中のトマチンの分析—トマチン含有量に対する加熱処理の影響—, 日本食品化学学会誌, 28(2), 54-62(2021)