

緑茶のピロリジジナルカロイド類の含有実態調査結果

農林水産省顧問（大臣官房参事官）
消費・安全局食品安全政策課

1. 調査の目的

欧州では、茶類のうち“Green tea”と称される茶にピロリジジナルカロイド類が含まれているとの報告があるが、この中に、国内で流通しているツバキ科ツバキ属のチャノキ（学名：*Camellia sinensis*）由来の茶が含まれているかどうかは不明であった^{注1}。そこで、今般、国内で“茶”として市販されている製品のうち、消費量が多い緑茶を対象に、ピロリジジナルカロイド類の含有実態を予備的に調査した。

注1 欧州で“Green tea”と称される茶は、我が国の緑茶とは異なり、緑茶や紅茶の原料であるツバキ科ツバキ属のチャノキ以外の植物が含まれている場合がある可能性がある。なお、これまでに、チャノキにピロリジジナルカロイド類が含まれるという報告はない。

2. 調査の概要

2.1. 調査対象

国内で市販されている、国産緑茶^{注2}を調査対象とした。

注2 「緑茶の表示基準実施細則」（公益社団法人日本茶業中央会、平成21年9月）第2条第1項第1号の表1に定めるもののうち、生産国が日本、原材料が「茶」又は「緑茶」であり、葉状又は葉を粉末にしたものを対象とした。

2.2. 調査点数

栽培方法や製造方法が異なる様々な茶種を対象とし、茶種別の点数は荒茶生産量に応じて配分した。茶種別の調査点数は以下のとおり。

煎茶……………	20点	釜炒り茶……………	1点
深蒸し煎茶……	3点	芽茶……………	3点
玉露……………	3点	茎茶……………	3点
かぶせ茶……………	3点	ほうじ茶……………	3点
番茶……………	11点	抹茶……………	5点
玉緑茶……………	2点	粉末茶……………	3点

2.3. 調査試料の採取

平成29年12月から平成30年2月までの間に、百貨店、スーパーマーケット、専門店等の小売店及びインターネット販売サイト等から購入した。同じ茶種内でも、品種、生産地、製造者等の重複ができるだけ少なくなるよう、入手可能な範囲で多様な製品を選択し、1点あたり50g以上の緑茶を購入した。

2.4. 分析法

ドイツ連邦リスク評価研究所（BfR）が公表した分析法（BfR-PA-Tea-2.0/2014）¹を一部変更し、液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いて分離・測定した。BfR-PA-Tea-2.0/2014 は、BfR がドイツを中心に 9 カ国計 21 検査機関の参加を得て、実験室間再現精度等を算出し、ピロリジジナルカロイド類の定量法の妥当性を評価した際に用いられた分析法（BfR-PA-Tea-1.0/2013）を、さらに改良したものである。

2.4.1. 分析項目

茶類に含まれる可能性があると考えられている 28 種類のピロリジジナルカロイド類のうち、以下の①～③の条件のいずれかに該当する分子種を分析対象とした。

- ① 欧州食品安全機関（EFSA）による報告（2015²、2017³）で、“Green tea” 中の濃度が定量限界以上であった 14 分子種
- ② EFSA による報告（2016）⁴で、“Green tea” 中の総ピロリジジナルカロイド類濃度に占める平均寄与率が上位の 10 分子種（これら 10 分子種の寄与率の合計は 86.7%）
- ③ ①②に該当する分子種の類縁体 4 分子種（同じ骨格を持つ分子種のうち、①②に該当する分子種が遊離塩基体のみの場合はその窒素酸化物、窒素酸化物のみの場合はその遊離塩基体を指す。）

これらの条件に該当したのは以下の 21 分子種^{注3}であった。

- | | |
|----------------|---------------|
| ・ユーロピン | ・リコプサミン |
| ・ユーロピン窒素酸化物 | ・リコプサミン窒素酸化物 |
| ・ヘリオトリン | ・レトロルシン |
| ・ヘリオトリン窒素酸化物 | ・レトロルシン窒素酸化物 |
| ・インターメディン | ・セネシオニン |
| ・インターメディン窒素酸化物 | ・セネシオニン窒素酸化物 |
| ・ジャコビン | ・セネシフィリン |
| ・ジャコビン窒素酸化物 | ・セネシフィリン窒素酸化物 |
| ・ラシオカルピン | ・セネシベルニン |
| ・ラシオカルピン窒素酸化物 | ・セネシベルニン窒素酸化物 |
| | ・センキルキン |

注3 この 21 分子種は、EFSA が 2017 年に食品のモニタリングで分析すべきピロリジジナルカロイド類として挙げた 17 分子種⁵のうち、はちみつに含まれることが分かっている 2 分子種を除いた 15 分子種をカバーしている。

¹ BfR. Determination of pyrrolizidine alkaloids (PA) in plant material by SPE-LC-MS/MS Method Protocol (BfR-PA-Tea-2.0/2014)

² EFSA. Occurrence of Pyrrolizidine Alkaloids in food (EFSA supporting publication 2015:EN-859)

³ EU Data Open Portal. Occurrence data on Pyrrolizidine Alkaloids (PAs) in food

⁴ EFSA. Dietary exposure assessment to pyrrolizidine alkaloids in the European population (EFSA Journal 2016;14(8):4572)

⁵ EFSA. Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements (EFSA Journal 2017;15(7):4908)

2.4.2. 試料の調製

購入した緑茶（茶葉）の全量を、内径 0.5 mm のメッシュをつけた超遠心粉碎機で粉碎・均質化し、 2.0 ± 0.1 g を量り取ったものを分析試料とした。分析試料にメタノール及び硫酸溶液を加えて超音波抽出を2回繰り返し、SPE カートリッジに負荷した後、アンモニアメタノール溶液で溶出した。ろ液を乾固し、メタノール・水混合溶液に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試料溶液とした。

試料の調製手順の概要を図1に示した。

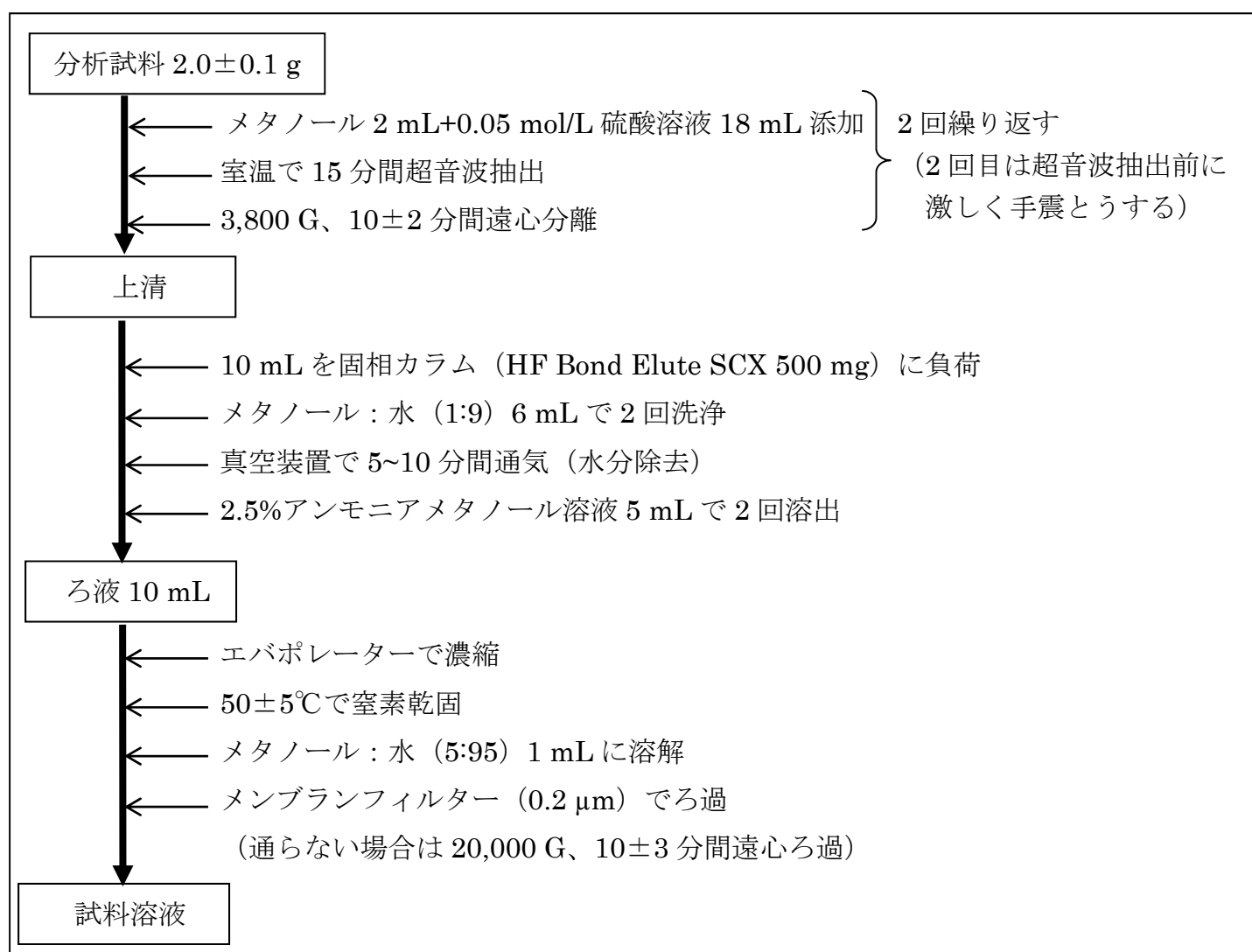


図1 試料の調製手順の概要

2.4.3. LC-MS/MS の条件

LC-MS/MS の条件を表 1、各分析種の設定質量数を表 2 に示す。

表 1 LC-MS/MS の設定条件

機種	Acquity UPLC (Waters)																					
検出器	Xevo TQ MS (Waters)																					
カラム	InertSustainC18 (2.1×150 mm、3.0 μm (GL Sciences))																					
カラム温度	40 °C																					
移動相	移動相 A:315 mg のギ酸アンモニウムを 5 mL の水で溶解し、1 mL のギ酸を添加後、水で 1 L に定容したもの 移動相 B:315 mg のギ酸アンモニウムを 5 mL の水で溶解し、1 mL のギ酸を添加後、メタノールで 1 L に定容したもの グラジエント条件: <table><tr><th>(min)</th><th>A (%)</th><th>B (%)</th></tr><tr><td>0</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>0.5</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>10.0</td><td>50</td><td>50</td></tr><tr><td>0.5</td><td>20</td><td>80</td></tr><tr><td>0.1</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>1.4</td><td>0</td><td>100</td></tr></table>	(min)	A (%)	B (%)	0	95	5	0.5	95	5	10.0	50	50	0.5	20	80	0.1	0	100	1.4	0	100
(min)	A (%)	B (%)																				
0	95	5																				
0.5	95	5																				
10.0	50	50																				
0.5	20	80																				
0.1	0	100																				
1.4	0	100																				
流速	0.3 mL/min																					
注入量	10 μL																					
MS	イオン化法：ESI 正イオンモード コロナ電流：3 μA イオン源温度：150°C プローブ温度：500°C コーンガス流量：窒素 50 L/h デゾルベーションガス流量：窒素 1000 L/h コリジョンガス流量：アルゴン 0.2 mL/min																					

表 2 各分析種の設定質量数等

分析種	プレカーサー イオン(m/z)	プロダクト イオン(m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョン エネルギー
ユーロピン	330.1	138.1	28	22
	330.1	156.2	28	28
ユーロピン窒素酸化物	346.1	172.1	36	32
	346.1	111.2	36	48
ヘリオトリン	314.2	138.3	28	20
	314.2	156.3	28	26

分析種	プレカーサー イオン(m/z)	プロダクト イオン(m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョン エネルギー
ヘリオトリン窒素酸化物	330.2	138.2	36	25
	330.2	172.1	36	28
インターメディン	300.1	138.3	32	18
	300.1	156.3	32	32
インターメディン窒素酸化物	316.1	111.2	40	40
	316.1	138.1	40	28
ジャコビン	352.1	155.2	36	28
	352.1	120.1	40	30
ジャコビン窒素酸化物	368.1	120.1	42	42
	368.1	296.1	42	24
ラシオカルピン	412.2	120.2	26	30
	412.2	336.3	26	18
ラシオカルピン窒素酸化物	428.2	254.1	38	28
	428.2	136.1	38	34
リコプサミン	300.1	138.3	30	18
	300.1	156.3	30	32
リコプサミン窒素酸化物	316.1	111.2	40	40
	316.1	138.1	40	28
レトロルシン	352.2	120.3	46	30
	352.2	138.3	46	32
レトロルシン窒素酸化物	368.2	136.2	36	35
	368.2	118.2	36	35
セネシオニン	336.2	138.2	38	28
	336.2	120.2	38	28
セネシオニン窒素酸化物	352.2	118.1	42	38
	352.2	136.3	42	36
セネシフィリン	334.2	120.3	42	26
	334.2	138.4	42	28
セネシフィリン窒素酸化物	350.2	118.2	42	30
	350.2	136.3	42	33
セネシベルニン	336.2	120.1	44	28
	336.2	138.1	44	30
セネシベルニン窒素酸化物	352.1	118.1	42	38
	352.1	120.1	40	30
センキルキン	366.2	150.3	36	26
	366.2	168.2	36	32

2.4.4. 検出限界及び定量限界

各分析種の標準試薬とメタノールで作成した 0.1 mg/mL 標準原液を、アセトニトリルを用いて希釈・混合し、1 µg/mL 混合標準溶液を作成した。この混合標準溶液と、ピロリジジナルカロイド類を添加しない緑茶を用いて調製した試料溶液で作成した 0.1~2.5 ng/mL の混合標準溶液を注入し、S/N=3 に相当する濃度を検出限界 (LOD)、S/N=10 に相当する濃度を定量限界 (LOQ) とした。調査を行った各分析種の LOD 及び LOQ を表 3 に示す。

表 3 調査を行った分析種の LOD 及び LOQ

分析種	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
ユーロピン	0.4	1.4
ユーロピン窒素酸化物	0.6	2.0
ヘリオトリン	0.2	0.7
ヘリオトリン窒素酸化物	0.3	0.9
インターメディン	0.8	2.6
インターメディン窒素酸化物	1.0	3.4
ジャコビン	1.1	3.6
ジャコビン窒素酸化物	1.2	4.1
ラシオカルピン	0.06	0.20
ラシオカルピン窒素酸化物	0.4	1.3
リコプサミン	1.5	5.0
リコプサミン窒素酸化物	0.7	2.3
レトロルシン	0.7	2.4
レトロルシン窒素酸化物	1.4	4.6
セネシオニン	1.7	5.7
セネシオニン窒素酸化物	0.5	1.8
セネシフィリン	1.1	3.8
セネシフィリン窒素酸化物	0.5	1.8
セネシベルニン	1.5	5.1
セネシベルニン窒素酸化物	0.7	2.4
センキルキン	0.3	1.0

2.4.5. 検量線

1 µg/mL 混合標準溶液と、ピロリジジナルカロイド類を添加しない緑茶を用いて調製した試料溶液で作成した 10~11 種類の濃度の混合標準溶液を用いて検量線を作成した。検量線は、いずれも相関係数が 0.995 以上を示した。

2.4.6. 添加回収率

緑茶に、表 4 に示す 2 濃度（LOQ 付近、検量線の間中間付近）に相当する量の各分析種の標準試薬をそれぞれ 3 回添加して分析し、平均添加回収率及び併行相対標準偏差（RSD_r）を求めた。各分析種の平均添加回収率は定量限界付近で 61~90%、検量線の間中間付近で 77%~103%の範囲であり、概ね許容できる範囲であった。なお、本調査の測定結果は回収率による補正はしていない。

各分析種の平均添加回収率及び RSD_r を表 4 に示す。

表 4 各分析種の平均添加回収率

分析種	添加濃度：LOQ 付近			添加濃度：検量線の間中間付近		
	添加濃度 (µg/kg)	平均添加 回収率 (%)	RSD _r (%)	添加濃度 (µg/kg)	平均添加 回収率 (%)	RSD _r (%)
ユーロピン	2	75.0	13.1	150	88.7	5.7
ユーロピン窒素酸化物	2	65.2	7.7	150	78.1	4.7
ヘリオトリン	1	80.8	5.8	150	102.9	7.0
ヘリオトリン窒素酸化物	1	83.1	8.0	150	96.8	3.9
インターメディン	3	62.4	10.8	150	79.6	11.2
インターメディン窒素酸化物	4	62.6	7.4	150	78.2	8.6
ジャコビン	4	87.7	14.8	150	99.9	5.7
ジャコビン窒素酸化物	5	70.9	4.1	150	86.2	1.8
ラシオカルピン	0.2	83.1	8.3	150	100.6	5.6
ラシオカルピン窒素酸化物	2	84.1	3.6	150	98.4	5.9
リコプサミン	5	70.4	15.2	150	77.9	4.9
リコプサミン窒素酸化物	3	61.0	7.7	150	77.5	6.6
レトロルシン	3	78.8	5.2	150	98.5	1.2
レトロルシン窒素酸化物	5	88.4	15.8	150	89.6	7.5
セネシオニン	6	84.1	2.7	150	94.1	4.7
セネシオニン窒素酸化物	2	70.9	16.3	150	93.6	10.5
セネシフィリン	4	77.6	10.6	150	90.0	6.4
セネシフィリン窒素酸化物	2	89.5	15.3	150	88.2	7.5
セネシベルニン	6	70.7	7.6	150	98.7	5.5
セネシベルニン窒素酸化物	3	88.6	3.8	150	93.7	3.0
センキルキン	1	89.5	9.4	150	103.1	2.2

2.4.7. 室内再現精度

分析種ごとに、表 5 に示す 2 種類の濃度（LOQ 付近及び検量線の間中間付近）に相当する量の標準試薬を添加した緑茶をあらかじめ調製した。同一試料の繰り返し精度試験（n=7）を異なる 3 日で各日 1 回ずつ実施し、各濃度における室内再現相対標準偏差（RSDi）を算出した。

各分析種の RSDi は一部を除いて概ね 20%以下であり、許容できる範囲であった。

分析種ごとの RSDi を表 5 に示す。

表 5 各分析種の室内再現精度

分析種	添加濃度：LOQ 付近		添加濃度：検量線の間中間付近	
	添加濃度 (µg/kg)	RSDi (%)	添加濃度 (µg/kg)	RSDi (%)
ユーロピン	2	13.0	150	7.6
ユーロピン窒素酸化物	2	16.1	150	4.3
ヘリオトリン	1	15.0	150	8.9
ヘリオトリン窒素酸化物	1	8.4	150	9.5
インターメディン	3	12.5	150	7.1
インターメディン窒素酸化物	4	11.2	150	5.0
ジャコビン	4	19.3	150	15.6
ジャコビン窒素酸化物	5	8.8	150	8.6
ラシオカルピン	0.2	13.5	150	10.1
ラシオカルピン窒素酸化物	2	9.3	150	7.6
リコブサミン	5	15.4	150	7.6
リコブサミン窒素酸化物	3	12.2	150	5.4
レトロルシン	3	15.6	150	13.2
レトロルシン窒素酸化物	5	23.2	150	5.8
セネシオニン	6	14.5	150	8.1
セネシオニン窒素酸化物	2	14.5	150	7.1
セネシフィリン	4	15.4	150	7.0
セネシフィリン窒素酸化物	2	18.6	150	8.2
セネシベルニン	6	14.0	150	10.8
セネシベルニン窒素酸化物	3	13.0	150	6.1
センキルキン	1	9.2	150	6.3

2.4.8. 精度管理（内部精度管理）

厚生労働省の「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」（平成9年4月1日付け衛食第117号厚生省生活衛生局食品保健課長通知）に準拠して実施し、適正に運用されていることを確認した。緑茶試料に150 µg/kg 相当のピロリジジナルカロイド類を添加し、試験日ごと（概ね12試料ごと）に1回添加回収試験を実施した結果、回収率は概ね70～120%の範囲内であった。

3. 分析の結果

緑茶中のピロリジジナルカロイド類の分析結果を表6に示す。調査した緑茶60点全てで、分析した21種のピロリジジナルカロイド類の濃度は全て定量限界未満であった。我が国で流通する緑茶にピロリジジナルカロイド類が含まれる可能性は低いと考えられる。また、海外でピロリジジナルカロイド類を含むと報告されている“Green tea”と称される茶は、チャノキ以外の植物が原料として使用されている、あるいは混合しており、そのような植物がピロリジジナルカロイド類を含んでいる可能性が考えられる。

表6 緑茶中のピロリジジナルカロイド類濃度

分析種	調査 点数	LOD (µg/kg)	LOD 未満の 点数 (割合)	LOQ (µg/kg)	LOQ 未満の 点数 (割合)
ユーロピン	60	0.4	60 (100%)	1.4	60 (100%)
ユーロピン窒素酸化物	60	0.6	60 (100%)	2.0	60 (100%)
ヘリオトリン	60	0.2	60 (100%)	0.7	60 (100%)
ヘリオトリン窒素酸化物	60	0.3	60 (100%)	0.9	60 (100%)
インターメディン	60	0.8	60 (100%)	2.6	60 (100%)
インターメディン窒素酸化物	60	1.0	60 (100%)	3.4	60 (100%)
ジャコビン	60	1.1	60 (100%)	3.6	60 (100%)
ジャコビン窒素酸化物	60	1.2	60 (100%)	4.1	60 (100%)
ラシオカルピン	60	0.06	60 (100%)	0.20	60 (100%)
ラシオカルピン窒素酸化物	60	0.4	60 (100%)	1.3	60 (100%)
リコプサミン	60	1.5	60 (100%)	5.0	60 (100%)
リコプサミン窒素酸化物	60	0.7	60 (100%)	2.3	60 (100%)
レトロルシン	60	0.7	60 (100%)	2.4	60 (100%)
レトロルシン窒素酸化物	60	1.4	60 (100%)	4.6	60 (100%)
セネシオニン	60	1.7	60 (100%)	5.7	60 (100%)
セネシオニン窒素酸化物	60	0.5	60 (100%)	1.8	60 (100%)
セネシフィリン	60	1.1	60 (100%)	3.8	60 (100%)
セネシフィリン窒素酸化物	60	0.5	60 (100%)	1.8	60 (100%)
セネシベルニン	60	1.5	60 (100%)	5.1	60 (100%)

分析種	調査 点数	LOD ($\mu\text{g/kg}$)	LOD 未満の 点数 (割合)	LOQ ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ 未満の 点数 (割合)
セネシベルニン窒素酸化物	60	0.7	60 (100%)	2.4	60 (100%)
センキルキン	60	0.3	58 (97%)	1.0	60 (100%)

4. 今後の取組

国産の緑茶にピロリジジナルカロイド類が含まれる可能性は低く、更なる調査やリスク管理措置の必要性は低い。ただし、チャノキ以外の植物を原料とし、茶のような製品として国内で製造・販売されているものについては、今後も必要に応じてピロリジジナルカロイド類の含有実態を調査する。