



図1 農薬PL情報の構築、活用等の概要

農薬標準品の管理簿

和名(別名)	登録番号	登録名称	登録内容	登録年月	登録内容	登録内容	登録内容	登録内容	登録内容	登録内容
フェンバレレート	1615	フェンバレレート	フェンバレレート	1995.03	2000.03	2000.03	2000.03	2000.03	2000.03	2000.03
フェンバレレート	1615	フェンバレレート	フェンバレレート	1995.03	2000.03	2000.03	2000.03	2000.03	2000.03	2000.03

フェンバレレート標準品情報表 (2) 1990-2000

標準品名	標準品名	登録番号	登録名称	登録内容	登録年月	登録内容	登録内容	登録内容	登録内容	登録内容
フェンバレレート	1615	フェンバレレート	フェンバレレート	1995.03	2000.03	2000.03	2000.03	2000.03	2000.03	2000.03

フェンバレレート標準品情報表 (3) 50 ppm

標準品名	標準品名	登録番号	登録名称	登録内容	登録年月	登録内容	登録内容	登録内容	登録内容	登録内容
フェンバレレート	1615	フェンバレレート	フェンバレレート	1995.03	2000.03	2000.03	2000.03	2000.03	2000.03	2000.03

図2 農薬標準品の管理簿

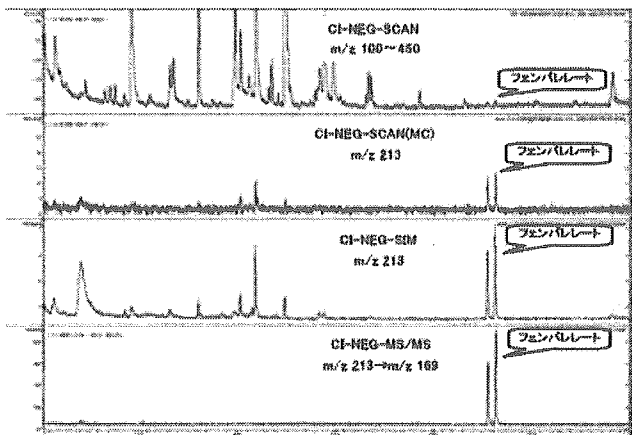


図3 野菜ジュースに添加したフェンバレレート(0.01ppm)のCI-NEG-SCAN (MC)、SIM、MS/MS

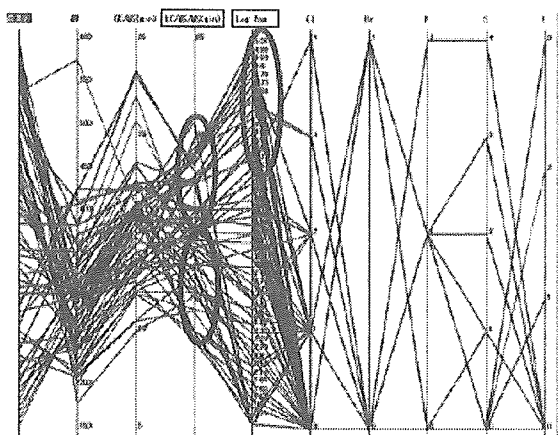


図4 ビジュアルデータマイニング

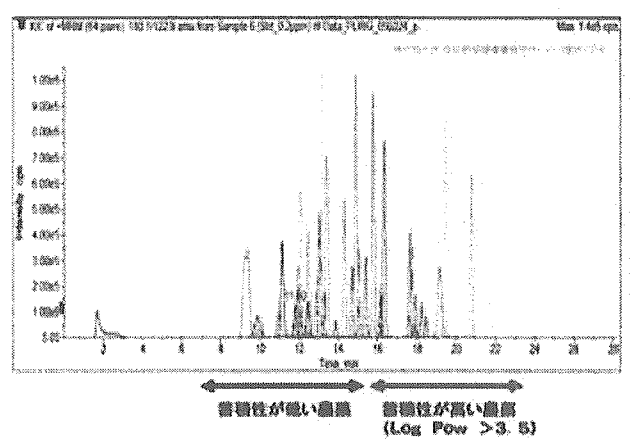


図5 LC/MS/MS/RTとlog Pow

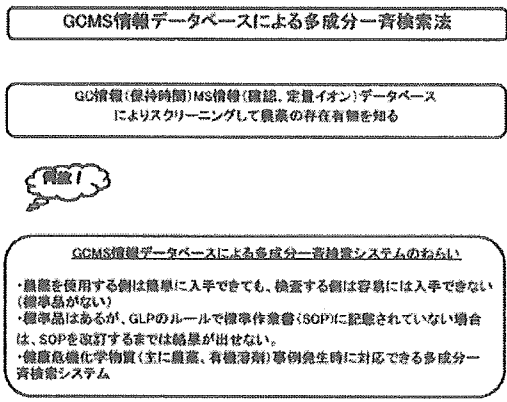


図6 GCMS情報データベースによるスクリーニング

LC/MS等による玄米中の農薬残留実態調査(第2報)

○上野英二、椛島由佳、大島晴美、松本 浩(愛知県衛生研究所)

【目的】水稲に使用される農薬の使用量は、減反や病害虫の発生予測の進歩、および農薬の効果的使用技術の普及などにより減少傾向にある。しかし近年、魚毒性が低いなど環境に優しい新規農薬に加え、気候などの地域条件を考慮した様々な混合剤が登録されるなど農薬の使用実態はさらに複雑になっている。また玄米には、平成17年3月末現在、126農薬について残留基準が設定されている。今後、200を超える農薬について暫定基準が設定されたのち、平成18年5月までにポジティブリスト制に移行することによって事実上すべての農薬が規制されることとなる。そこで今回は、これまで玄米について広範の農薬を対象に実施してきた残留モニタリングの結果や農薬の使用量の推移などを考慮したうえで残留実態に即した農薬の選抜を試み、主としてLC/MSを用いた費用対効果に優れる多成分分析法を検討した。さらに、本法を用いて玄米中残留農薬の調理による消長についても調査したので報告する。

【方法】**試料:**国内産玄米、**対象農薬:**45農薬、**試験溶液の調製:**Scheme 1に準じて試験溶液を調製した。**GPC装置:**ShodexのCLNpak EV-2000 カラム(20 mmid.×300 mm)およびCLNpak EV-Gガードカラム(20 mmid.×100 mm)を装着した島津全自動GPCクリーンアップシステムを用いた。グラファイトカーボンカラムはガラスリザーバー(Varian,8.5mL)にグラファイトカーボン(Supelco,Carbotrap C,20/40mesh,10m²/g)-微結晶セルロース(Merck,Avicel)(1:4)250mg、次いで無水硫酸ナトリウム 1gを充てんしたものをGPCコレクターチューブに装着して用いた。**LC/MS装置:**島津製のLC-VP高圧グラジエントシステム、オートサンプラSIL-HTA、高速液体クロマトグラフ質量分析計LCMS-2010A、カラム:資生堂CAPCELL PAK C18 AQ(150mm×2mmid,3mm)および同ガードカラム(10mm×2mmid,3mm)を以下の条件で用いた。移動相 アセトニトリル-10mM酢酸アンモニウム[(10:90)→(95:5)]25min+(95:5)7min+[(95:5)→(10:90)]4min+(10:90)14min、流量(0.20mL/min)12min+(0.20→0.32mL/min)20min+(0.32→0.20mL/min)4min+(0.20mL/min)14min、カラム温度 40℃、注入量 5mL、MSインターフェイス Positive(4.5kV)-Negative(3.5kV) switching ESI(1.2sec/cycle)、ネブライザーガス 1.5L/min、ドラインガス 10L/min、測定モード SIM

【結果と考察】**対象農薬:**Table 1に、平成7~16年度の10年間に行ったモニタリングにおける検出農薬を示した。検出頻度の高い農薬は、フサライド、エトフェンプロックス、フェノブカルブ、イプロベンホスなどの殺虫剤と殺菌剤であった。また、両剤の組み合わせで複数の農薬が検出される検体が多かった。厚生労働省から示されているポジティブリスト制度における暫定基準(最終案)に対する残留量%(MRLs,%)は、平均値 8.3%(中央値 2.5%)であった。特に、イソキサチオンなどの有機リン系農薬は基準値が低く設定されていることから平均値17.7%(中央値5.7%)と高かつ

た。これらの結果および水稲への農薬の使用量などを考慮した上で、残留性・毒性の点から問題となる有機リン系農薬を始め 45 農薬を選抜した。分析法: 玄米は比較的油脂を多く含有している。また、クロロフィルなどの色素も少なからず含有し、これらの測定に与える影響は無視できないと考えられた。そこでGPCを用い、色素が重なって溶出する農薬画分(60~70mL)のみを選択的にグラファイトカーボンカラムに通過させて自動精製する手法を導入した。なお、グラファイトカーボンは農薬を完全に溶出させるために保持力の弱いものを採用した。本法により、有害なトルエンを使用することなく、油脂や色素を効率良く除去しながら、すべての農薬で 75%以上の良好な添加回収率が得られた。LC/MSによる測定には、対象農薬を一度に高感度に定量するためにポジネガswitching ESIおよびSIMモードを採用した。測定条件の最適化を図ることにより、シラフルオフェンなどを除いてppbレベル(20pgでS/Nが 15 以上)の定量感度が得られた。なお、測定の妨害となるような夾雑物ピークは見られなかったが、GPCにより検出された農薬の溶出画分を選択的に分取精製後、Q-array電圧を上げることによって生じる特徴的なフラグメントイオンを確認することによって多くの農薬を確実に同定することができた。調理過程での消長: 平成 11~16 年度のモニタリングにおいて、比較的高濃度で農薬が検出された玄米 27 検体(延べ 37 農薬:MRL,%の平均値 20.0%)を用いて、実際に摂食することを想定して、精米、米とぎおよび炊飯による残留農薬の消長について調査した。精米には家庭用精米器(MKライスポリッシャー)を用い、米とぎは 5 回、炊飯は電気炊飯器で行った。それぞれの過程における残留農薬のMRL,%の平均値を求め、玄米を 100%としてFig.1 に示した。精米では多くの農薬で 80%以上がぬかの部分に残留していたことから 19%と大きく減少し、玄米中の残留農薬を除去するには精米が最も有効であることが示唆された。精米の米とぎでは白米部分への浸透移行が認められた農薬の一部が米粉と共に洗い流されたことから 12%に、さらに炊飯では 8%に減少した。なお、玄米のままの堅い状態で米をといだ場合、残留農薬はほとんど減少せず、炊飯でも調理前の 70%程度に減少するに留まった。精米に比べて残留農薬の摂取量が多くなると予想される玄米食品については、生産段階での安全性確保により一層の努力が必要であると考えられた。

LC/MS/MSによる食品中残留農薬一斉分析法の検討

○ 宇治田正則（和歌山市衛生研究所）

1 はじめに

平成 15 年 5 月における改正食品衛生法の改正により、平成 18 年 5 月からポジティブリスト制が施行されるに伴い、各地研では標準品の確保及び GC/MS (GC/MS/MS) 及び LC/MS (LC/MS/MS) による多成分一斉分析法の検討が行われてきた。一方、厚生労働省は GC/MS 及び LC/MS (LC/MS/MS) による一斉分析法の方向を示し、平成 17 年 6 月には最終案が提示された。当所では、従来から GPC と GC/MS/MS を用いた一斉分析法により 100 農薬について検査を行ってきた。平成 16 年度には健康危機管理における地研の連携モデル事業「農薬等ポジティブリスト制に向けた近畿地研の取り組み」で新たに 76 農薬が入手できたため、平成 15 年度に整備した LC/MS/MS を用い、221 農薬について、メソッドの作成と実試料への適用について検討した。

2 方法

1. 試料

ほうれん草、たまねぎ、にんじん、玄米

2. 対象農薬

221 農薬を対象とし、表 1 に農薬の一部を示した。

3. 装置及び条件

① LC/MS/MS : API3000 (アプライドバイシステムズ) LC (Agilent1100)

② MS/MS メソッド

イオン化モード: ESI (Positive), 分析法: MRM, Dwell Time: 10msec, Turbo Gas: 7L/min, NEB: 10Psi, CUR: 15, CAD: 6, IonSprayVoltage: 5kV, TEM: 500°C, DP (Declustering Potential), CE (Collision Energy) は農薬ごとに最適化

③ LC 条件

カラム: Imtakt Cadenza CD-C18 150×2mm (3µm), 移動相: 2mM ギ酸アンモニウム/メタノール, 流速: 200µL/min, カラム温度: 25°C, 注入量: 8µL

4. 標準溶液の調製

標準溶液は、最大 20 を限度として質量数が重ならないよう 50mg/L 又は 25mg/L のアセトン溶液で、15 グループ (A~O) に分割して調製した。

5. 試験溶液の調製

試料 25g をフードカッターで細切り後、アセトニトリル 60mL でホモジナイズ後ろ過し、100mL に定容した。添加回収試験は、試料中の濃度が 0.020 µg/g になるように抽出液 20mL に添加し、

固相カートリッジ C₁₈ 2 段または Multisep PR に付加後、塩化ナトリウム 10g 及び NaCl 飽和 0.5M リン酸緩衝溶液 10mL を加え、アセトニトリル層を分取し、無水硫酸ナトリウムで脱水後濃縮し、メタノール 5mL に定容して LC/MS/MS 用の試験溶液とした。ENVICarb/LC-NH₂ は、塩化ナトリウム 10g 及び NaCl 飽和 0.5M リン酸緩衝溶液 10mL を加え、アセトニトリル層を分取し、無水硫酸ナトリウムで脱水後濃縮し、トルエン:アセトニトリル (1:3) 2mL に溶解し、この抽出液を付加し、トルエン:アセトニトリル (1:3) 20mL で溶出、濃縮後、メタノールで 5mL に定容して LC/MS/MS 用の試験溶液とした。

3 結果及び考察

1. 検量線

検量線濃度として、アセトンに溶解した 15 グループ 221 農薬をメタノールで 1 µg/mL に調製し、適宜メタノールで希釈して 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 75.0, 100ng/mL 標準溶液を調製した。農薬ごとに最適化した DP, CE を用い、メソッドを作成したところ、大部分の農薬が二次式になる傾向が見られた。これは農薬のピーク感度が強すぎるためだと考えられたため、CE, DP の値を調整することで 0.1 (S/N 比 3 以上) ~ 100 µg/L の範囲で、r 値が 0.9990 以上の良好な検量線が得られた。

一方、ethoxyquin, chlorfenapyr, chloroneb, dicofol, prothiofos, chinomethionat, tetracotazole, procymidone, ethofenprox, folpet, chlorobenzilate, amitraz, amitrole, captan, PCNB, diquat, paraquat, bifenthrin, tecnazene, nitrothal isopropyl, vinclozolin, methoxychlor 等 22 農薬は検量線を作成することができなかった。

2. 添加回収試験と固相

食品中の残留農薬のクリーンアップ法には GPC、固相等による方法が一般的であり、GPC 法は溶媒使用量が多い問題があるため、C₁₈, ENVICarb/LC-NH₂, Multisep PR 等の固相を用いて検量線を作成できた 199 農薬について添加回収試験を実施した。

添加回収試験結果の一部を表 1 に示す。

1) ENVICarb/LC-NH₂

bensulfuron methyl, diclomedine の 2 農薬は全く回収されなかった。これらの農薬は ENVICarb/LC-NH2 への保持が強く、カラムから回収されないことに起因していた。50%以上の回収率が得られた農薬の数は、にんじんで 188、ほうれん草で 190、玄米で 195、たまねぎで 145 であり、たまねぎを除き作物間の差はみられなかった。70%以上ではそれぞれ、158、176、183、70 であり、特にたまねぎの場合、たまねぎ由来の成分が除去されず、イオン化阻害を起こしているものと思われる。

2) C₁₈カラム 2 段

全て回収することができたが、50%以上の回収率が得られた農薬の数は、にんじんで 192、ほうれん草で 178、玄米で 187、たまねぎで 119 であった。70%以上では、それぞれ 151、114、151、25 であり、ENVICarb/LC-NH2 の方がイオン化阻害が少なく、回収率のよい結果が得られた。

3) Multisep PR

全て回収することができたが、50%以上の回収率が得られた農薬の数は、にんじんで 187、ほうれん草で 172、玄米で 145、たまねぎで 138 であった。70%以上では、それぞれ 155、130、36、59 であり、この固相は作物由来の影響を排除することが難しく、著しいイオン化阻害を起こすため、LC/MS/MS のクリーンアップには適しないと思われる。

dimethipin は、たまねぎの場合において、いずれの固相でも 211.1/137.0、DP=41、CE=11 の条件では、妨害成分がみられ定量することができなかった。その他の作物では問題なかった。

3. LC/MS/MS によるイオン化阻害とマトリックス効果

LC/MS/MS では、マトリックス効果よりもイオン化阻害による回収率の低下がよく見られる。図 1 は phosalone におけるほうれん草を 4 倍濃縮した時のクリーンアップによるイオン化阻害が顕著に見られる例である。

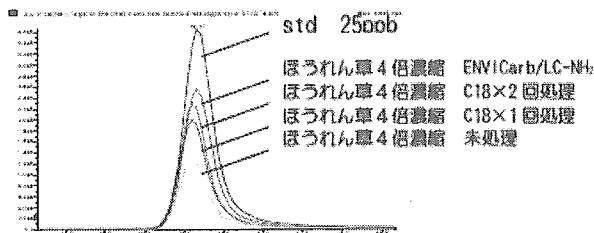


図 1 phosalone におけるイオン化阻害の例

cypermethrin の場合、ほうれん草の回収率が ENVICarb/LC-NH2 で 227%、C₁₈ 2 段で 181%、

Multosep PR で 211% と標準や他の作物に比べピーク感度が高くマトリックス効果がみられたため、LC/MS/MS 分析においても作物によっては標準添加法で定量する必要があると考えられた。

表 1 農薬の作物からの回収率 (%) 抜粋

	にんじん		ほうれん草		玄米		たまねぎ	
	回収率%	cv%	回収率%	cv%	回収率%	cv%	回収率%	cv%
A								
carbaryl (RAC)	77.7	2.0	88.5	0.8	84.0	4.7	43.8	3.7
dichlofluanid	85.7	4.5	88.5	8.2	100.0	9.4	14.8	11.8
dichlorvos	65.2	4.9	81.3	10.0	75.8	3.3	52.9	2.0
dimethenamid	82.3	4.4	98.0	0.0	88.8	9.9	52.9	2.9
terbufos	78.3	4.6	88.5	5.3	89.3	3.8	79.0	7.5
fenthion	100.0	2.3	100.0	8.1	83.2	8.9	70.5	1.2
myclobutanil	90.8	3.2	95.3	8.5	90.8	3.2	52.4	4.4
methoprene	70.3	8.2	78.0	1.3	79.3	1.8	74.3	4.4
edifenphos	101.0	6.3	88.5	14.6	92.7	0.8	70.0	7.0
dimethipin	58.0	8.2	83.2	11.8	84.2	10.0	70.0	5.8
trichloride	73.5	5.8	81.0	4.7	78.5	2.8	74.2	9.4
sulfoxide	33.5	14.8	59.7	10.4	91.2	8.5	55.7	2.7
B								
etoxazole	80.4	7.4	88.5	4.3	100.0	1.0	84.5	4.3
ethoprophos	84.5	4.1	84.2	3.3	98.2	3.4	73.3	2.8
cymoxanil	92.2	7.8	71.5	1.9	98.0	2.9	38.9	9.8
diazinon	82.7	7.1	90.0	3.5	88.3	5.9	84.7	3.9
atamr	80.8	10.4	80.3	20.2	84.2	11.7	65.8	18.8
triflumizole	83.3	1.8	71.5	12.4	73.3	8.8	73.0	7.0
parathion methyl	78.0	4.2	91.8	1.8	85.7	8.4	71.3	3.3
pyraflufen ethyl	103.2	7.9	107.0	3.7	111.8	9.9	102.3	8.1
pyridaben	83.7	6.1	86.8	7.4	71.3	13.7	87.0	18.8
flusilazole	79.7	8.9	86.7	7.4	103.5	2.1	70.2	6.8
penconazole	84.3	3.4	86.5	3.1	101.7	3.8	72.5	4.8
penoxycuron	99.8	10.8	112.2	3.3	119.3	8.2	70.0	4.8
bendiocarb	80.0	8.7	105.5	4.8	94.8	4.5	87.7	8.1
isoprocarb	62.2	3.2	97.8	13.3	94.2	2.0	19.9	9.0
esprocarb	81.7	2.8	98.5	2.2	94.7	3.8	75.3	2.8
pretilachlor	83.2	8.4	87.2	8.4	74.7	10.5	82.5	5.0
metenacet	82.8	7.4	87.3	12.3	85.3	3.8	85.7	6.2
C								
alachlor	88.7	3.2	100.5	5.9	101.7	3.7	87.0	2.3
isofenphos	88.0	4.8	88.5	3.8	89.1	2.8	73.7	3.8
aresoxim methyl	87.3	8.8	88.0	5.5	87.8	8.4	57.0	15.8
chlorpyrifos	84.8	8.8	84.0	4.3	84.8	3.7	84.2	8.9
cypermethrin	75.6	5.9	227.3	4.1	88.5	5.3	88.7	4.7
cypermethrin	79.8	8.5	78.7	2.9	91.3	4.8	84.5	1.2
tebuconazole	91.3	1.9	109.8	7.1	104.3	4.8	78.5	8.3
cyaclofop	86.3	10.1	82.7	8.7	83.8	13.9	84.5	14.1
hexaconazole	80.8	9.4	83.7	0.7	97.2	2.9	89.7	2.9
permethrin	82.0	15.8	72.5	12.0	71.3	13.8	80.5	18.1
marathon	96.3	8.3	98.0	16.4	98.8	9.7	55.7	18.1
etrimfos	74.7	5.2	80.8	3.7	85.2	4.4	89.3	0.8
bifenox	78.2	11.5	98.0	0.0	85.6	7.0	54.5	8.4
pynbutocarb	75.5	4.8	85.8	8.0	82.2	3.8	89.8	1.7
fensulfotriazin	79.2	3.5	103.3	3.9	88.8	10.6	38.0	13.7
D								
EPTC	51.0	23.0	71.3	13.2	82.8	12.7	87.8	12.3
cyhalothrin	89.7	0.3	74.7	7.5	103.2	2.5	83.8	13.8
diflufenican	51.7	17.2	80.8	7.2	88.5	0.0	44.1	8.8
cyprodinil	89.2	8.2	100.7	8.8	101.7	3.9	84.7	12.3
deltamethrin	110.0	16.9	78.7	8.7	103.8	8.8	101.3	7.7
trifluralin	47.8	14.0	80.7	8.8	80.3	8.9	88.5	1.8
bisulfenol	87.8	8.6	91.0	7.2	99.2	4.3	79.8	2.8
fenitrothion (MEP)	88.8	0.8	88.7	10.1	82.0	3.0	89.2	8.9
phenothate	81.3	3.2	82.8	4.5	84.8	2.8	80.5	8.9
propiconazole	78.2	3.8	88.7	1.7	84.2	9.4	89.1	8.9
EPN	78.7	7.7	81.8	8.8	83.3	11.1	33.0	18.3
etbenzazid	89.3	5.2	94.2	1.8	102.8	4.5	43.9	18.1
diflufenicarb	51.1	18.4	100.0	1.0	82.8	8.8	79.8	4.4
butachlor	72.2	3.5	82.8	0.3	94.0	3.7	72.3	2.3
E								
cadusafos	82.5	3.5	89.8	3.4	102.7	8.2	94.3	4.8
dieldrin	80.2	13.9	109.0	2.4	78.8	11.8	84.7	5.9
pirimiphos methyl	80.2	12.8	100.0	8.2	85.2	11.1	89.8	3.9
fenarimol	82.5	4.2	78.8	5.5	108.2	7.8	83.5	8.2
fenpropaflin	82.5	15.0	111.4	4.8	85.2	8.0	73.7	8.1
flucythrinate	59.8	8.5	101.7	0.8	100.3	8.1	88.2	11.1
flutolanil	85.2	3.5	87.0	2.2	99.3	7.3	82.0	13.5
fluvalinate	85.2	3.8	78.2	13.8	58.8	11.8	83.5	8.1
prochloraz	80.2	5.2	88.0	6.8	101.2	3.3	57.7	5.8
pendimethalin	72.2	8.3	88.3	8.1	83.8	2.9	78.2	7.1
phosalone	76.3	8.2	103.7	2.8	102.8	9.1	84.7	2.2
dimethylvinphos(E)	81.7	2.0	94.3	4.8	97.0	12.3	59.7	13.0
oxifenfos(E)	54.7	2.8	85.7	8.8	89.8	9.4	82.4	12.4
F								
imazalil	88.3	3.8	87.8	4.8	93.3	2.7	73.8	8.1
uniconazole P	87.2	5.9	86.3	8.9	88.7	1.8	83.0	1.8
difenoconazole	84.5	8.1	77.7	16.4	88.2	5.2	83.3	14.7
cyfluthrin	45.8	24.3	118.3	3.8	84.5	4.8	84.3	18.8
tebufenpyrad	87.3	12.3	89.2	10.0	75.8	7.3	74.7	4.6
tralomethrin	71.5	7.1	100.3	19.8	87.8	8.3	89.5	28.1
saclbutirazole	87.8	8.8	77.5	14.0	103.8	8.7	88.8	15.5
parathion	108.8	9.8	98.2	7.3	113.0	5.4	87.0	5.7
fenvalerate	77.7	7.7	72.3	8.8	88.0	7.8	77.7	7.7
butamifos	82.5	3.8	87.0	11.4	104.5	3.7	84.2	8.4
metolachlor	83.5	3.3	89.3	4.3	99.2	5.1	85.7	8.1
cyhalofop butyl	77.3	9.7	81.5	2.3	99.7	5.5	83.5	23.2
G								
aldicarb	71.8	5.3	91.7	3.3	85.8	4.2	83.0	5.8
iprodione	81.2	2.2	80.8	3.1	102.7	8.8	80.0	3.1
oxamyl	71.0	3.2	72.5	3.8	84.5	4.8	72.5	3.8
clofentazine	82.0	10.9	88.8	8.8	89.8	7.8	84.1	10.8
diflufenzuron	106.3	11.2	97.8	12.3	110.8	3.7	82.2	8.3
vamidolion	73.9	7.0	70.3	4.3	84.5	4.1	88.9	8.8
fenpyroximate	88.3	1.7	71.3	8.5	83.7	5.7	81.7	13.3
H								
bensulfuron methyl	---	---	---	---	---	---	---	---
phoxim	87.0	4.8	89.8	10.3	103.8	3.7	84.8	3.8
methabenzthiazuron	87.8	8.8	77.5	4.8	103.2	2.0	51.2	4.8
ethiofencarb	75.8	8.2	71.8	10.3	89.5	9.3	89.2	8.9
diclomedine	---	---	---	---	---	---	---	---

農作物中の残留農薬一斉分析への GC/MS(SCAN 法)の適用と作物成分の影響 (4) -EIによる検討(その2)-

新潟県保健環境科学研究所
 (株) 島津製作所

○ 酒井洋, 近藤園絵, 土田由里子
 田中幸樹, 宮川治彦, 中川勝博

【目的】

平成18年5月には食品衛生法の残留農薬基準にポジティブリスト制が導入される。その対応のため、演者らは、GC/MS(SCAN)を用いた一斉分析を検討し、報告¹⁾してきた。今回、約300近い農薬について、低濃度領域で共存する作物成分が分析値にどの程度影響するのか検討したので報告する。

【方法】

分析対象農薬および濃度設定 GC/MS測定が可能と考えられる286農薬を対象とした。原則として、農作物の残留基準値の1/10が定性定量的に判定できることを条件として濃度を設定した。

分析対象農作物 玄米、大豆、オレンジ、りんご、キャベツ、ばれいしょ、ほうれんそうの7作物とした。

試験溶液の調製 試験溶液の調製はFig.1に従って行った。

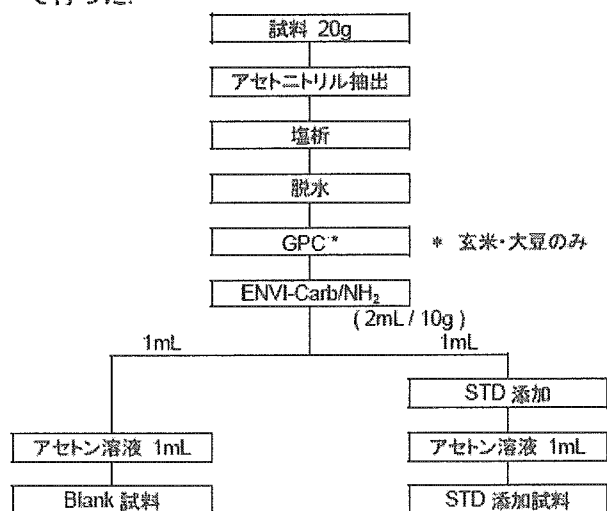


Fig.1 試験溶液の調製法

GC/MS測定条件 Table 1にGC/MSの測定条件を示した。全ての作物で測定を開始する前に装置の保守(新品のインサート、プレカラム、洗浄イオン源への交換)を行ない、Blank試料(起爆)3回 → STD 2回(検量線用) → Blank試料3回 → STD → STD添加試料3回 → STDの順で測定した。定量イオン

は農薬ごとに7作物共通の1イオンを設定した。解析結果はSTD添加試料の検出値から、Blank試料で求めたBlank値を差し引き、STDに対する百分率で表して、これを分析値とした。

Table 1. GC/MS測定条件

GC/MS system	島津製作所製 GCMS-QP2010
Carrier gas	高純度 He. 1.69mL/min (47.2cm/sec)
Pre-column	ヒューズシリカチューブ (2m)
Column	RESTEK 社製 Rtx®-5MS (0.25mm i.d.×30m, 0.25µm)
Column Temp.	50°C (1min) → 25°C/min → 125°C (0min) → 10°C/min → 320°C (5min)
Injection Temp.	280°C
I/F. Temp.	280°C
IonSource Temp.	200°C
Injection mode	splitless, 2min (1µL)
MS method	SCAN
	EI: m/z 70 - 460 (4.4 - 24min)

【結果と考察】

農薬と分析値 Acetochlor, Aldrin等130農薬は全作物で良好に定性、定量できた。また、Acetamiprid, Acrinathrin等68農薬は全作物で定性は良好であったが、一部作物で分析値が150%以上の高値を示すものもあり、その点に留意すれば、分析値を得ることができると考えられた。Allethrin, Cypermethrin等56農薬は一部作物で定性定量が困難であった。一方、Acephate, Bifenox等19農薬が全作物で定性定量が不可能であった。

作物成分の影響 ばれいしょは夾雑物質による妨害が少なく、良好な分析値であった。玄米、大豆、りんごおよびキャベツも比較的夾雑物質による妨害が少なく、分析値も良好であった。オレンジおよびほうれんそうは夾雑物質による妨害が多く、そのため、分析値の得られない農薬がいくつかあった。

以上のことから、GC/MS(SCAN)-EI法はポジティブリスト制施行後の農薬検査の一次分析法として有用であると考えられる。

1) (社)日本食品衛生学会第87 & 88 学術講演会で報告

GC/MS (SCAN法)による農産物中残留農薬一斉分析法の検討

○小林ゆかり, 近藤園絵, 土田由里子, 小林麻子, 大川妙子, 酒井洋
(新潟県保健環境科学研究所)

【はじめに】

平成18年に予定される食品衛生法のポジティブリスト制の導入に対応するため、当所ではGC/MS (SCAN法)を用いた一斉分析を検討してきたところである¹⁾。今回、残留基準レベルの濃度において分析が可能かどうかを検討するため、作物への添加回収試験を行ったので、その結果を報告する。

【実験方法】

1 対象農薬及び濃度設定

GC/MSによる一斉分析法の適用が可能と考えられる124農薬を対象とし、原則として残留基準(作物により基準が異なる場合は、最も厳しい基準)に相当する濃度となるよう、作物に添加した。

2 対象作物

キュウリ、トマト、カキ、ナス、ダイコン、アスパラガス、ブドウ、モモ、バナナ、セロリ、ネギ、タマネギ、シイタケの13作物を対象とした。

3 試験方法

試料溶液の調整方法をFig.1に、測定条件をTable 1に示した。

なお、1種の農薬について複数のピークが検出されたものについては、ピークごとに解析を行った。

Sample 20g
↓←(Std添加)
↓←アセトニトリル(50mL, 25mL)
ホモジナイズ
遠心分離(3000rpm, 5min)
上清100mL定容、25mL分取
↓←リン酸緩衝液(pH7.0)25mL
↓←NaCl 12.5g
振とう
↓
アセトニトリル層
↓
脱水(無水硫酸ナトリウム)
↓
濃縮 トルエン:アセトニトリル(1:3)転溶
↓
ENVI-Carb/NH₂
↓トルエン:アセトニトリル(1:3)20mL溶出
アセトン1mL定容

Table 1 GC/MS測定条件

GC/MS system	備島津製作所製 GCMS-QP2010
Carrier gas	高純度He, 1.69mL/min (47.2cm/sec)
Pre-column	ヒューズドシリカチューブ(2m)
Column	RESTEK社製 Rtx [®] -5MS (0.25mm i.d. × 30m, 0.25 μm)
Column Temp.	50°C (1min) →25°C/min→125°C (0min) →10°C/min→300°C (10min)
Injection Temp.	280°C
I/F Temp.	280°C
Ion Source Temp.	200°C
Injection mode	splitless, 2min (1 μL)
MS method	SCAN EI:m/z 70-460 (4.4-26min)

注) GC/MSへの注入は、無添加試料3回注入→Std(回収率50%相当)→添加試料1検体→Std(回収率100%相当)→添加試料2検体→Std(回収率200%相当)の順に行った。

Fig.1 試料溶液の調製

【結果及び考察】

全作物について良好な回収率(70%以上120%以下)が得られた農薬は、74成分あった(Table 2)。Bifenoxはアスパラガスで回収されず、Butachlor、Pretilachlor、Thenylchlorはダイコ

ンで回収率50%以下であったが、他の作物ではおおむね良好な回収率であった。Dichlorvos、EPTC、Folpet、Pyrimidifenはほとんど全ての作物で回収率が70%以下であった。Chinomethionatは全作物でほとんど回収されなかった。Cypermethrin-1はキュウリで回収率178%となった。Pyrethrin-2はアスパラガスで回収率44%となった一方、タマネギでは回収率190%であった。Captafol、Captan、Chlofentezine、Deltamethrin、Dichlofluamid、Inabenfide、Methamidophos、Propamocarbは、作物によって回収率が異なり、良好な結果を得られたものからほとんど回収されないものまでであった。これらの農薬は、同一作物での並行試験(n=3)の中でもCV>30%と測定結果がかなりばらつく場合があった。

なお、一部の農薬については、夾雑成分の妨害を避けるため、作物によって定量イオンを変更したケースがあった。実試料の分析の際には、複数のイオンで定量して確認するなど、十分注意する必要があると考えられた。

Table 2 各農薬の回収率の状況

Acephate	B	Cyhalofop-butyl	A	Fenarimol	A	Methoprene	A'	Pyrimidifen	C
Acetamidprid	A	Cyhalothrin-1	B	Fenitrothion	A	Metolachlor	A'	Pyriminobac-methyl(E)	A
Acrinathrin	A'	Cyhalothrin-2	A'	Fenpropathrin	A	Myclobutanil	A	Pyriminobac-methyl(Z)	A
Alachlor	A'	Cypermethrin-1	C	Fensulfotthion	A'	o,p'-DDT	A'	Pyriproxyfen	A
Aldrin	A	Cypermethrin-2	A'	Fenthion	A	p,p'-DDD	A'	Quinalphos	B
Benfuresate	A'	Cypermethrin-3	A'	Fenvalerate-1	A	p,p'-DDE	A'	Tebuconazole	A
Bifenoxy	C	Cypermethrin-4	A'	Fenvalerate-2	A	p,p'-DDT	A	Tebufenpyrad	A'
Bifenthrin	A	Cyproconazole	A	Flucythrinate-1	A	Pacrobutrazol	A	Tefluthrin	A'
Bitertanol-1	A'	Deltamethrin	C	Flucythrinate-2	A	Parathion	A	Terbacil	A
Bitertanol-2	A	Diazinon	A	Fludioxonil	A	Parathion-methyl	A	Terbufos	A'
Butachlor	C	Dichlofluamid	C	Flusilazole	A	Penconazole	A	Tetraconazole	A
Butamifos	A	Dichlorvos	C	Flutolanil	A	Pendimethalin	A	Thenylchlor	C
Cadusafos	A	Dicofol	A'	Fluvalinate-1	A	Permethrin-1	A	Thiufuzamide	B
Cafenstrole	A	Dieldrin	B	Fluvalinate-2	A'	Permethrin-2	A	Thiobencarb	A
Captafol	C	Diethofencarb	A	Folpet	C	Phenthoate	A	Thiometon	A'
Captan	C	Difenoconazole-1	A	Fosthiazate-1	A	Phosalon	A'	Tolclofos-methyl	A'
Chinomethionat	D	Difenoconazole-2	A	Fosthiazate-2	A	Pirimiphos-methyl	A	Triadimenol-1	A
Chlofentezine	C	Diffenican	A	Halfenprox	A	Pretilachlor	C	Triadimenol-2	A'
Chlorfenapyr	A	Dimethenamid	A'	Hexaconazole	A'	Propamocarb	C	Tricyclazole	A'
Chlorfenvinphos(α)	A	Dimethoate	A	Imibenconazole	A	Propiconazole-1	A'	Trifluralin	A'
Chlorfenvinphos(β)	A	Dimethylvinphos	A'	Inabenfide	C	Propiconazole-2	A'	Uniconazole-P	A
Chlorobenzilate	A	Edifenphos	A	Isofenphos	A	Prothiophos	A'	α -BHC	A'
Chlorpropham	A	Endrin	B	Isoprocarb	A'	Pyraclofos	A	β -BHC	A
Chlorpyrifos	B	EPN	A	Kresoxim-methyl	A'	Pyrethrin-1	A	γ -BHC	A'
Cyanazine	A'	EPTC	C	Lenacil	A	Pyrethrin-2	C	δ -BHC	A
Cyfluthrin-1	A	Esprocarb	A	Malathion	A	Pyributicarb	A		
Cyfluthrin-2	A	Ethoprophos	A	Mefenacet	A	Pyridaben	A		
Cyfluthrin-3	A	Ettoxazole	A'	Mepronil	A	Pyrifenoxy-E	A'		
Cyfluthrin-4	A'	Etrinfos	A'	Methamidophos	C	Pyrifenoxy-Z	A'		

A 全ての作物で70%以上120%以下 A' 全ての作物で60%以上130%以下 B 全ての作物で50%以上150%以下

C 50%未満または150%超の作物がある D 全ての作物でほとんど回収されない

注) 1種の農薬について複数のピークが検出された場合、保持時間の順に「Bitertanol-1」等と記載した。

【まとめ】

GC/MS(SCAN法)による農作物中残留農薬の一斉分析法を検討した。その結果、多くの農薬について良好な結果を得ることができ、有用な方法であると考えられた。しかし、作物によって回収率が異なるなど、注意を要する農薬もあった。

今後は、さらに対象農薬及び対象作物を増やして検討を加えるとともに、低濃度での定量についても検討したい。

1) (社)日本食品衛生学会第87,88,90回学術講演会で報告

テトラブロモビスフェノール A の 3T3-L1 培養脂肪細胞に及ぼす影響

○福井美緒 1, 大村厚子 2, 竹熊美貴子 2, 岩崎雄介 1, 伊藤里恵 1, 斉藤貢一 1, 中澤裕之 1(1 星薬大, 2 埼玉衛生研)

【目的】

食生活の欧米化や運動不足などの生活習慣の変化に伴い、高血圧、高脂血症、糖尿病に代表される生活習慣病の罹患者が増加している。そして、これらの疾患の発症には、脂肪細胞に過剰の脂肪が蓄積した状態である肥満が、大きく関与している。近年、ダイオキシン (TCDD) と糖尿病の関連性が示唆され、また、内分泌かく乱作用が懸念されているビスフェノール A(BPA)では、細胞への分化を促進する作用や、インスリンの存在下で中性脂肪の蓄積を促進する作用が報告されている。化学物質の脂肪細胞に及ぼす影響について関心が高まっていることから、BPA に化学構造が類似しており、難燃剤として広く使用されている、テトラブロモビスフェノール A (TBBPA) を用い、脂肪細胞の脂肪蓄積に及ぼす影響を検討した。

【方法】

マウス繊維芽細胞 (3T3-L1 細胞) を、分化誘導培地で培養し、脂肪細胞に分化させた。この分化した細胞を、インスリンや TBBPA を含む培地で培養し、脂肪合成活性の指標となる GPDH 活性と、細胞内に蓄積された中性脂肪量の測定を行った。GPDH 活性の測定は、GPDH 活性測定キットを用いた。中性脂肪量は、脂肪細胞内に蓄積された脂肪を、オイルレッド O 染色液で染色後、分光光度計(540nm)で測定した。

【結果及び考察】

脂肪細胞に、インスリンと TBBPA を添加すると、インスリン単独で添加したとよりも、高値の GPDH 活性を示した。また、インスリン非存在下に TBBPA を添加すると、脂肪滴が形成されたことが顕微鏡で確認でき、GPDH 活性も上昇した。このことから、TBBPA が中性脂肪の蓄積を促進することが示唆された。

遺伝子組換えトウモロコシ(Mon810) 定量検査法の外部精度管理について

○渡邊敏浩¹, 菊地博之¹, 笠間菊子², 鈴木達也²,
大島赴夫², 日野明寛³, 穂山浩¹, 米谷民雄¹

(¹国立医薬品食品衛生研究所, ²財)食品薬品安全センター秦野研究所, ³(独)食品総合研究所)

【緒言】厚生労働省は、厚生省告示 232 号, 233 号(平成 12 年 5 月 1 日)により食品衛生法に基づく遺伝子組換え(GM)食品の安全性審査を義務づけ、平成 13 年 3 月からは、厚生労働省医薬局食品保健部長通知「食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部改正」(平成 13 年 3 月 15 日, 食発第 79 号)に基づく GM 食品の表示制度を施行している。本表示制度において、安全性審査を終了した GM 食品に関しては、原材料中の重量が上位 3 品目に含まれ、かつ食品中に 5% を超えて含まれる場合には「遺伝子組換え」の旨、また、分別生産流通管理されていない原材料を含む場合には「遺伝子組換え不分別」の旨、表示しなければならない。これに関連し、表示内容の科学的検証を目的とした検知技術が開発され、厚生労働省医薬局食品保健部長通知「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」により GM 食品の検査方法が定められている。検査方法を準用するにあたり、検査結果に影響を与える種々の要因を明らかにし、その結果をもって信頼性確保の一助とすることが期待されるため、精度管理の実施は分析試験において必須である。本研究では、検査方法が定められている GM トウモロコシのうち、Mon810 系統ならびに GA21 系統を対象とする定量検査方法についての外部精度管理方法を検討することを目的とし、33 機関による共同試験を試験的に実施し、集計された共通未知試料の分析結果の相互比較を通じて、検査機関によるばらつきの程度ならびにその要因について詳細な検討を行った。

【方法】試料：GM トウモロコシ・Mon810 ならびに GA21 試料は厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課を通じて入手した。また、疑似混入試料調製時のマトリクスとして使用した非遺伝子組換え(non-GM)トウモロコシ試料(米国産トウモロコシ)は Quality technology international 社から入手した。入手した全てのトウモロコシ試料を 500 μm のスクリーンを取り付けた高速遠心粉砕器を用いて粉砕した。Non-GM トウモロコシ試料については粉砕後、定量 PCR 法を用いた分析を行い、0.4% 程度の GM トウモロコシの混入(主として Mon810 系統)を確認した上で、マトリクス試料として用いることとした。マトリクス試料に対し、Mon810 ならびに GA21 試料を重量換算でそれぞれ 1.0% となるよう混合した試料を低濃度試料、Mon810 試料を 1.0%、GA21 試料を 5.0% となるよう混合した試料を高濃度試料とした。試料調製後、低濃度試料を約 7 g、高濃度試料を約 20 g となるよう、それぞれ 25 mL 容、50 mL 容の遠沈管 60 本に秤量分注し小分け試料とした。均一性試験：小分け試料の均一性については、全試料の 10% に相当する 6 点を無作為選出し定量 PCR 法による測定を行い、得られた定量値を一元配置の分散分析および Student t 検定により解析することで統計的に確認した。安定性試験：6 点の小分け試料を無作為選出し、 -20°C で保存し、試料送付の直前および共同試験終了の直後に定量 PCR 法による測定を行った。F 検定の結果、等分散と判定された測定項目については Student t 検定により、また、不等分散と判定された測定項目については Aspin-Welch t 検定により解析を行った。試料の送付：調製した低濃度および高濃度試料の小分け試料各 1 点、実施要領、および報告様式を参加機関に送付した。また、これに合わせて食安発第 0628001 号(平成 16 年 6 月 28 日)に従い試験するものとし、当該通知を詳解したマニュアルを作成し、同送した。試験結果の回収ならびに統計解析：各機関から報告された定量値(GM トウモロコシ含量)について統計処理(基本統計量、順序統計量、ヒストグラム、正規確率プロット、Xbar-R 管理図の作成および Z-スコアの算出)を

行った。また、本年度報告された定量値には、他機関との比較により逸脱の明らかな値が含まれていたため、正確な統計解析を行うことを目的にデータ・クリーニングを行い、平均±3S.D.の範囲を超えた定量値については、以降の統計処理から除外した。

【結果及び考察】**試料検証試験**：均一性試験の結果、低濃度試料を対象とした場合には、CaM 定量系にて $1.58 \pm 0.20\%$ 、Mon810 系統特異的定量系にて $1.67 \pm 0.14\%$ 、GA21 系統特異的定量系にて $1.38 \pm 0.21\%$ 、また高濃度試料に対し、CaM 定量系にて $1.61 \pm 0.16\%$ 、Mon810 系統特異的定量系にて $1.85 \pm 0.21\%$ 、GA21 系統特異的定量系にて $6.38 \pm 0.35\%$ の定量値が得られた。統計解析の結果からは、全ての試料が均一であると確認された。また、保存前後に得られた定量値に有意差は認められず、試料の安定性が確認された。**DNA 抽出試験**：参加全 33 機関中、28 機関がシリカゲル膜タイプキット法を、5 機関が CTAB 法を DNA 抽出法として採用しており、シリカベースレジソタイプキット法を採用した機関は無かった。また、通知記載の方法に改変を加えた CTAB 法を採用した機関が複数認められたが、これら機関から報告された DNA 収量およびその質は、他の機関からの報告と大きく異なっていた。また、高濃度試料から分取した 9 検体の結果を用いて収量のばらつきについて解析した結果、全機関でのばらつきの平均(相対標準偏差：R.S.D.の平均)が 14.66%であったのに対し、25%を超える大きなばらつきを示した機関が 3 機関認められた。**SS17b 測定値のばらつき**：同一試料から均一に DNA が抽出され、かつ PCR に正しく供された場合、基本的に内在性遺伝子のコピー数は一点に集約すると考えられる。高濃度試料について報告された SS17b 遺伝子コピー数を対象に解析した結果、他の機関のばらつきの平均(R.S.D.の平均値:12.19%)に比べ、明らかに大きなばらつきを示した機関が 5 機関認められた。**定量 PCR 試験**：平均±3S.D.の範囲を超えた定量値を報告した機関においては、定量値の算出方法に誤りが認められた。報告されたデータを元に再解析を行った結果、統計解析上の問題は認められなかったが、データの確認体制が必要であると考えられた。低濃度試料を対象とした場合、上記 1 機関を除く 32 機関から報告された CaM 定量値および GA21 定量値の平均±S.D.は、それぞれ 1.75 ± 0.28 および 1.43 ± 0.23 であり、その合算値(総 GM トウモロコシ含量)の平均±S.D.は 3.18 ± 0.43 であった。また、Xbar および Z-スコアの絶対値が 2 を超えた機関が CaM 定量値および GA21 定量値についてそれぞれ 3 機関、総 GM トウモロコシ含量について 2 機関、R が管理限界を越えた機関がそれぞれの項目につき 1 機関ずつ認められた。高濃度試料を対象とした場合、CaM 定量値および GA21 定量値の平均±S.D.は、それぞれ 1.69 ± 0.27 および 6.62 ± 0.96 であった。さらに、総 GM トウモロコシ含量の平均±S.D.は 8.31 ± 1.04 であった。また、Xbar および Z-スコアの絶対値が 2 を超えた機関が CaM 定量値について 3 機関、GA21 定量値について 2 機関、また総 GM トウモロコシ含量について 1 機関、R が管理限界を越えた機関が CaM 定量値および GA21 定量値についてそれぞれ 2 機関、総 GM トウモロコシ含量について 1 機関認められた。上記問題の認められた機関からは「SS17b 遺伝子コピー数のばらつきが大きい」、「検量線の相関係数が規定値を下回っている」、「non template control においてシグナルが検出される」等の結果、および「試験方法から逸脱」のいずれかが報告されており、主として手技の不備や試験法の理解が不十分であることが原因として推定された。また、R が管理限界を超えた機関のうち、数機関に関しては、検査法自体が有するばらつきの範囲内と思われるばらつきを報告した機関もあり、統計解析の方法についても今後改めていく必要性が考えられた。

【謝辞】本研究は厚生労働省医薬食品局食品安全部の平成 16 年度食品等試験検査費により実施した。本試験にご参加いただきました各検査機関の諸氏に深謝いたします。

Program Number: 638

Day / Time: Sunday, Dec. 18, 4:00 PM - 6:00 PM

Basic research on development of scallop tissue reference material for diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in quality assurance

M.Kawasaki¹; Y.Ohshima¹; Y.Itoh²; S.Yamamoto²; K.Machii²

1. Hatano Research Institute Food and Drug Safety Center, Hadano Kanagawa, Japan; 2. National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) serves gastrointestinal illness caused by consumption of shellfish contaminated with toxigenic dinoflagellates. The main toxins responsible for DSP are okadaic acid (OA) and its derivatives. In this work reference material for mouse bioassay is provided by OA standard and DSP negative homogenized slurry independently. It is occasionally observed that increase of free fatty acids (FFA) in the hepatopancreas (HP) of scallops during storage interferes with the mouse bioassay for DSP. Determination of OA and FFA were performed by liquid chromatography with fluorometric detector of anthryl diazomethane (ADAM) derivatives. FFA composition and toxicity were surveyed in homogenized scallop tissue keep in the freezer at -70 °C for four months. Most of the samples were non toxic at mouse bioassay and low concentration of FFA, but few samples exist in both toxic and high concentration of FFA. These results suggest that the determination FFA in tissue by HPLC coupled with the mouse bioassay for DSP is important for reference material. It is under investigation of OA about adequate quantity, spiked method and stability.

Citation: M.Kawasaki, Y.Ohshima, Y.Itoh, S.Yamamoto, K.Machii. Basic research on development of scallop tissue reference material for diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in quality assurance. Program No. 638. *2005 Abstract Viewer*. Honolulu, Hawaii: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

Application Design and Programming Copyright ScholarOne, Inc. All Rights Reserved. Patent Pending.