

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、栴島由佳、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(20mmid.×300mm)およびCLNpak EV-Gガードカラム(20mmid.×100mm)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。グラフアイトカーボンカラムはガラスリザーバー(Varian,8.5mL)にグラフアイトカーボン(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、オートサンブラ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 : API 3000 (アブ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 1µg/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, tetracozazole, 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 ENVI Carb/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、ENVI Carb/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。

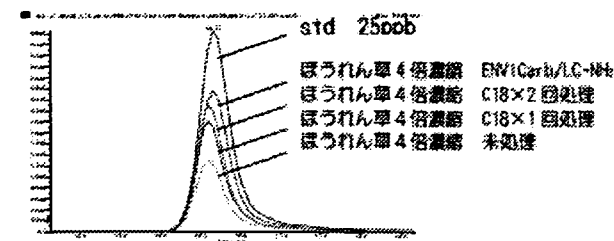


図 1 phosalone におけるイオン化阻害の例

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

Multisep 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%	
ENVI Carb LC-NH2 (n=3)									
A	carbaryl (PAC)	77.7	2.9	68.2	3.0	65.0	5.7	63.0	6.7
	dichlufanil	85.7	4.5	85.0	8.2	100.0	0.4	14.3	11.9
	disulfoton	85.7	4.4	81.3	10.9	75.3	3.3	94.0	0.3
	dimethenamid	85.7	4.4	90.0	0.6	85.0	0.9	82.8	3.8
	fenitrothion	76.3	4.6	85.0	5.3	82.3	3.8	70.0	7.5
	fenitrothion	122.9	2.3	100.0	0.3	83.2	0.9	70.0	1.2
	myclobutanil	90.3	3.2	90.3	5.5	90.3	3.2	52.4	4.4
	methoprene	70.3	2.2	76.0	1.3	76.3	1.0	74.3	4.4
	edifenphos	101.0	0.3	80.5	14.6	92.7	0.8	73.0	7.0
	zinmethylin	55.0	0.3	85.2	11.9	89.2	5.0	70.0	2.8
trifluralin	73.5	5.8	81.0	4.7	78.5	2.6	74.3	8.4	
isothiazole	83.5	14.0	85.7	13.4	81.2	5.5	55.7	2.7	
etoxazole	90.3	7.4	85.5	4.3	100.2	1.0	94.5	4.3	
ethionoxos	84.5	4.1	84.2	3.3	83.2	3.4	73.3	2.9	
cymoxanil	92.3	7.8	71.5	1.9	95.8	2.9	33.0	6.8	
diazinon	82.7	7.1	90.0	3.0	85.3	3.8	82.7	5.9	
azims	100.5	10.4	82.3	20.2	94.2	11.7	93.9	10.9	
trifluzole	83.3	1.2	77.9	12.4	73.3	6.0	73.7	7.9	
parathion methyl	78.0	4.2	81.8	1.8	65.7	6.4	71.0	5.9	
pyratlufos ethyl	103.2	7.9	85.8	1.4	77.5	6.9	102.3	0.3	
pyridaben	83.7	6.1	90.0	1.4	103.5	1.1	78.3	0.5	
flusilazole	79.7	6.9	90.0	3.3	101.7	3.0	72.0	5.9	
permethrin	94.3	3.4	90.0	3.3	101.7	3.0	72.0	5.9	
peroxyacarb	86.8	10.5	112.2	3.3	119.3	5.2	79.0	4.9	
peroxyacarb	85.9	5.7	100.0	4.0	94.8	4.0	57.7	5.1	
isoprocarb	82.2	3.3	87.8	13.3	94.2	2.0	19.0	0.3	
esprocarb	81.7	2.8	94.0	2.2	94.7	3.0	10.3	2.0	
prethachlor	83.2	6.4	87.2	8.4	74.7	10.5	82.5	0.8	
metfenacet	82.3	7.4	87.9	12.3	85.3	5.9	55.7	0.9	
atachlor	86.7	3.2	100.0	0.9	101.7	3.1	57.3	1.3	
isofenphos	86.0	4.0	96.8	3.3	95.7	2.9	73.7	0.8	
krasazin methyl	87.3	6.0	86.0	5.5	97.8	5.4	57.0	15.9	
chlorpyrifos	84.8	6.6	94.9	4.3	84.0	3.7	93.2	0.9	
cypermethrin	76.8	5.9	227.0	4.3	88.5	5.3	88.7	4.7	
tebuconazole	70.0	9.5	74.7	2.8	81.3	6.3	49.0	3.2	
pyraclofos	21.3	1.2	105.9	7.3	104.3	9.6	78.0	6.3	
fenbuacarb	86.3	10.3	82.7	6.7	93.8	13.0	90.0	16.1	
hexaconazole	80.8	0.4	83.7	9.7	97.2	2.9	89.7	2.9	
permethrin	82.9	15.2	72.9	12.0	77.5	13.6	85.0	15.1	
marathion	86.3	8.3	86.9	16.4	93.3	2.7	55.7	1.9	
esimfos	74.7	5.1	89.8	3.4	85.3	8.4	54.5	0.5	
biensol	78.2	11.5	88.0	9.0	85.3	7.0	56.5	5.4	
pyrimicarb	75.4	4.2	93.8	9.0	92.2	3.0	89.0	7.7	
fenprothion	79.2	3.5	103.3	3.2	86.8	10.6	89.0	15.7	
E-PP	31.0	23.0	71.9	13.2	82.3	12.7	87.0	13.3	
cymlochlorin	69.7	0.3	74.7	1.0	103.2	2.0	83.0	13.9	
disulfenacil	81.7	17.2	80.0	7.2	88.5	3.0	44.7	8.6	
cyprothiim	84.2	6.2	100.0	0.0	101.7	0.9	12.3	12.3	
deftamethrin	110.0	10.9	70.7	0.7	100.0	0.0	131.3	1.7	
endosulfan	47.9	14.0	90.7	9.0	83.3	0.9	88.0	1.3	
bifenox	67.0	0.6	97.0	7.2	89.2	4.3	79.8	2.0	
fenitrothion (MEP)	86.8	0.6	86.7	10.3	92.9	3.0	89.2	9.9	
phenthoate	81.3	3.2	92.5	4.5	94.9	2.0	49.0	0.5	
propiconazole	76.2	5.8	86.7	7.7	94.2	5.4	89.7	6.8	
EPN	82.3	2.5	92.2	12.3	86.3	6.4	83.7	9.7	
esobenzanil	28.7	7.7	51.5	0.9	63.3	11.1	33.0	9.9	
dimethenacarb	80.3	5.2	94.2	1.3	102.8	6.0	43.9	10.7	
tolpofos methyl	51.1	15.4	102.2	1.0	92.8	8.6	70.0	4.4	
butachlor	73.2	3.3	82.0	0.3	94.0	3.7	72.3	2.9	
caboxifos	82.3	3.9	100.0	3.4	100.0	11.0	94.7	8.8	
disulfon	80.2	13.9	100.0	2.4	75.3	11.6	84.7	5.9	
fenoxycarbonyl methyl	80.2	12.0	100.0	0.3	97.2	11.1	89.9	6.9	
fenarimol	82.5	4.2	76.5	5.6	109.2	7.6	83.5	5.2	
fenproprathrin	82.6	15.0	111.9	4.0	89.1	6.0	73.7	4.1	
fluorfenate	82.8	6.5	101.7	0.8	100.3	8.1	88.2	11.1	
flusilazole	94.3	3.4	97.0	2.2	94.3	7.3	82.0	5.0	
flusilazole	85.2	3.8	78.2	13.8	84.9	11.8	83.5	5.1	
prochloraz	90.3	0.2	80.0	0.0	101.2	3.3	81.7	5.5	
pendimethalin	72.2	8.3	86.3	6.5	83.3	2.0	70.2	7.1	
phosalone	78.2	6.3	103.7	2.5	102.9	8.1	94.7	3.2	
dimethylinphos(E)	81.7	2.0	94.3	4.5	87.0	12.3	59.7	13.0	
surfactant(F)	54.7	2.8	65.7	5.9	60.3	6.4	52.4	12.4	
imazali	85.3	8.6	87.9	4.6	92.3	2.7	73.2	4.1	
uniconazole P	87.2	6.9	86.3	5.9	95.7	1.6	83.0	1.9	
difenoconazole	64.5	6.1	77.7	18.4	82.5	5.2	83.3	14.7	
cyfluthrin	45.0	24.8	116.3	3.9	54.9	7.8	74.3	12.8	
labuconpyrad	67.3	12.8	83.2	10.3	75.3	7.3	34.7	4.5	
tralomethrin	71.5	7.1	102.3	19.2	81.0	6.3	44.0	6.1	
padflobutrazole	97.9	5.8	77.5	14.3	105.3	3.7	33.5	13.3	
parathion	122.9	0.6	88.2	7.5	115.3	3.4	84.7	6.7	
fenvalerate	77.7	7.7	87.3	9.8	84.0	7.0	77.7	9.4	
butamifos	82.2	3.2	87.3	6.3	94.2	5.7	83.7	0.1	
metolachlor	85.5	3.8	89.3	4.3	94.2	5.7	83.0	23.2	
cyprothiim butyl	77.3	6.7	81.0	2.3	89.7	6.0	83.0	0.1	
atachlor	71.9	5.3	87.7	3.3	85.9	4.2	52.0	5.9	
proclione	81.3	2.2	100.0	3.3	102.7	0.8	90.0	3.1	
oxamyl	71.3	3.2	72.0	3.8	84.6	4.8	72.0	3.9	
clofentazine	82.9	10.9	30.9	0.4	94.9	7.0	38.1	13.0	
disulfenacil	104.0	11.2	97.0	12.3	110.0	3.7	82.2	9.3	
voradethion	73.8	7.0	70.9	4.3	84.5	4.1	88.3	0.8	
fenproprathrin	83.3	7.7	77.9	0.5	85.7	0.7	81.7	13.3	
atachlor methyl									
phenim	87.8	4.0	89.0	10.3	103.2	0.7	94.8	3.9	
methabenzthiazuron	87.8	6.8	77.5	4.0	105.2	2.0	81.2	4.9	
ethofencarb	75.8	8.2	71.5	10.3	83.3	6.3	39.3	3.9	
difenoxime									

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
 榑 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。

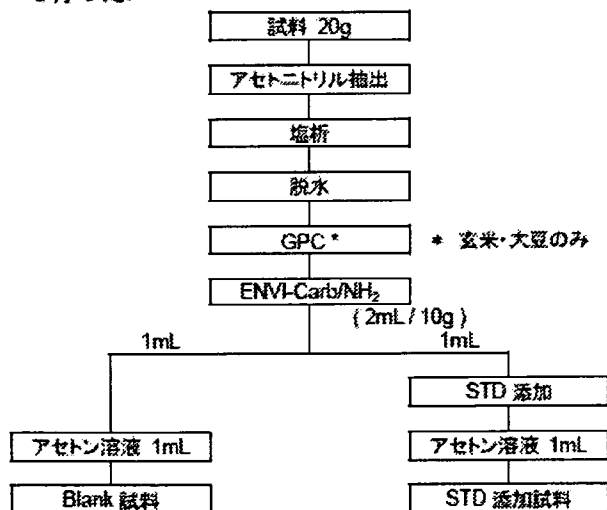


Fig.1 試験溶液の調製法

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	榑島津製作所製 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, 0.25µm)
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	株式会社島津製作所製 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, 0.25μm)
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(1μL)
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、Dichlofluanid、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
Acetaziprid	A	Cyhalothrin-1	B	Fenitrothion	A	Metolachlor	A'	Pyriminobac-methyl(E)	A
Aerinaethrin	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'	Fenitthion	A	p,p'-DDD	A'	Quinalphos	B
Benfuresate	A'	Cypermethrin-3	A'	Fenvalerate-1	A	p,p'-DDE	A'	Tebuconazole	A
Bifenox	C	Cypermethrin-4	A'	Fenvalerate-2	A	p,p'-DDT	A	Tebuconpyrad	A'
Bifenthrin	A	Cyproconazole	A	Flucythrinate-1	A	Paclobutrazol	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	Dichlofluanid	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	Phosalan	A'	Tolclofos-methyl	A'
Chinomethionat	D	Difenoconazole-2	A	Fosthiazate-2	A	Pirimiphos-methyl	A	Triadimenol-1	A
Chlofentezine	C	Disfenican	A	Halfeprax	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	Dimethylinphos	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'	Pyraclifos	A	β -BHC	A
Chlorpyrifos	B	EPN	A	Krezoxim-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	Etoxazole	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

○渡邊敬浩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³, 米谷民雄³(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薬野研究所, ³(株)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。**SSIIb 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SSIIb 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、その含算値(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 が管理限界を超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「SSIIb 遺伝子コピー数のばらつきが大きい」、「検査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 assuranceM.Kawasaki¹; Y.Ohshima¹; Y.Itoh²; S.Yamamoto²; K.Machii²

1. *Hadano 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.

農薬等のポジティブリスト化に伴う検査の 精度管理に関する研究（第1報）

○住本建夫¹、織田 肇¹、岩上正藏¹、田中之雄¹、村田 弘¹、
起橋雅浩¹、高取 聡¹、北川陽子¹、岡本 葉¹、酒井 洋²、
上野英二³、田中敏嗣⁴、宇野正清⁵、宇治田正則⁶、佐々木珠生⁷、
堤 泰造⁸、衛藤修一⁹

(¹大阪府立公衆衛生研究所、²新潟県保健環境科学研究所、³愛知県衛生研究所、
⁴神戸市環境保健研究所、⁵奈良県保健環境研究センター、⁶和歌山市衛生研究所、
⁷広島市衛生研究所、⁸徳島県保健環境センター、⁹北九州市環境科学研究所)

A. 目的

農薬等のポジティブリスト制(平成18年5月29日施行)の施行に伴い、多くの検査項目についての確かな検査が要求され、その検査結果の信頼性確保が重要な課題となっている。現在、各検査機関では厚生労働省の示す個別分析法や一斉試験法に準拠した試験法や独自の検査標準作業書(SOP)を作成し、その試験法の真度、精度及び定量限界は各検査機関の判断により、検査を行っているのが現状である。そして内部精度管理により、検査の信頼性を確保しているが、その方法として、既知の農薬を既知の濃度添加し、その回収率により判定するのが一般的である。そのため、回収率にフレが認められた場合、真値に近づけるように修正され、SOPの評価が正確でない場合がある。そこで、当所も含め9機関の地方衛生研究所の参加協力を得て、従来から重要性が指摘されている外部精度管理試験を用い、各検査機関のSOPの評価と信頼性確保のための要因等について検討を行うことを目的とした。

B. 方法

1. 実施日程

年2回行った、ラウンド1は平成17年9月14日から10月11日、ラウンド2は平成17年11月22日から12月13日で実施した。

2. 添加農薬

研究協力9機関が実施している農薬検査項目はのべ197種類、そのうち共通する農薬が23種類であった。ラウンド1では23種類のうちから10種類を、ラウンド2では23種類全部を添加農薬指定リストとし、その中から3あるいは4種類の農薬を添加した。

3. 精度管理用試料の調製

精度管理用食材は、均質で大量に必要なことから、トマトジュースと野菜ジュースは市販品を、レッドピーマンとジャガイモは、業務用の冷凍磨砕マイクロペースト状食材

(12-16kg)を試料として用いた。添加農薬は和光純薬製残留農薬試験用を使用し、表1に示す添加農薬の種類及び設定濃度になるように農薬混合アセトン溶液を調製し、添加した。この農薬添加試料と農薬無添加の対照試料を冷凍後、各研究協力機関に冷凍宅配便で送付した。

送付した試料の均質性については精度管理用試料15個から無作為に5個の容器を選び、それぞれ2回採取して測定を行った。また、添加農薬の安定性については試料を送付してから1ヶ月後に各食品5試料を測定し、添加濃度が変動しないことを確認した。

4. 検査方法

各機関の農薬検査標準作業書に従って5回試行の実施を求めた。

5. 結果の集計と評価方法

各機関から報告された定量値について、各々の検査項目毎に有意水準5%で異常値の棄却検定を行った後、基本統計量、ヒストグラム、正規確率プロット、 \bar{X} -R管理図、zスコアを求め、機関内変動と機関間変動について客観的評価を行った。

C. 結果及び考察

1. 精度管理用試料の均質性及び安定性

調製した試料は設定添加量の92%-112%の定量値が得られ、試料調製方法の妥当性が確認された。試料の均質性は5試料から得られた定量値の一元配置分散分析の結果により確認した。試料を-20℃で1ヶ月間保存した場合にも定量値に大きな変動がなく、少なくとも検査期間(2-3週間)内の添加農薬の安定性は確認された。均質な市販品や冷凍磨砕マイクロペースト状食材の使用と業務用ミキサー等の導入により、試料調製の方法を確立することができた。

2. 外部精度管理試験の結果

各機関からの5回測定値の平均値について、異常値の有無の検定(有意水準5%)を行ったが、棄却された値はなかった。全機関が添加された農薬の種類をすべて正しく検出した。各検査項目の全体の平均値は良好な結果が得られたが、品質管理などに用いられている Xbar-R 管理図による方法と各機関における検査精度の相対的な判定に有効な z-スコアによる方法で評価したところ、適正域に入っていない機関が認められた。特に、Xbar 管理図で 70-120% に入っていない機関が表1の通り、野菜ジュースのクロルピリホス、シベルメトリンを除いて多く認められた。R 管理図及び z-スコアにおいては、1機関が適正域に入っていないことが認められた。各機関が4食品の14農薬について定量値を提出したが、Xbar-R 管理図、z-スコアによる評価ですべて「十分管理されている」と評価される機関が2機関あった。

3. 要因分析

精度の違いを生じる要因を知るために、アンケート調査及び SOP からの主な項目を投入し、データの絞込みや分類による探索的データ分析(ビジュアルデータマイニング: 視覚化データ処理技術)の手法を用いて精度の傾向を調べたところ、アセトニトリルの抽出回数や最終検液量・検量線濃度など GC への負荷の程度等が関与して精度に影響を及ぼしていた。つまり、各機関の SOP の違いと精度の違いとは関連しており、すべて適正であった機関における試験法は食品の農薬検査に推奨できる試験法と言える。これらの機関による研修や使用している SOP を参考にすることで精度管理の向上に大きく寄与できるものと思われた。

D. まとめ

1. 9 地方衛生研究所による共同外部精度試験を、各参加機関の SOP による検査法で実施した。精度管理用試料 4 のべ 14 種類の農薬を添加した食品 4 種類を用い、5 回の測定値を求めた。
2. 精度管理用試料を調製し、添加農薬濃度の妥当性、均質性および安定性について検討を行い、適正な試料を参加機関に提供した。
3. 全機関が添加された農薬の種類をすべて正しく検出した。5 回測定値の平均値について、異常値の有無の検定を行ったが、棄却された値はなかった。各検査項目の全体の平均値は良好な結果が得られたが、Xbar-R 管理図による方法と検査精度の相対的な判定に有効な z-スコアによる方法で評価したところ、各検査項目で、Xbar-R 管理図および z-スコアで適正域に入っていない機関が認められた。
4. 探索的データ分析(ビジュアルデータマイニング)による要因解析の結果、アセトニトリルによる抽出回数、夾雑物除去方法、検量線濃度幅等各機関の SOP の違いが精度に影響していると考えられた。
5. 内部精度管理では得られない各機関の SOP の偏りや測定値の傾向が外部精度管理調査を実施したことにより得られた。

E. 謝辞

本研究は平成17年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)により行った。

表1 結果の集計

調製試料	添加農薬名	設定濃度 (ppm)	調製時の平均値 ±標準偏差	9機関の平均値 ±標準偏差	Xbar 管理図 「良好」判定数	R 管理図 「良好」判定数	z-スコア 「良好」判定数
トマトジュース	ダイアジノン	0.1	0.100±0.001	0.087±0.026	5	8	9
	クロルピリホス	0.4	0.413±0.006	0.360±0.070	7	8	9
	フェニトロチオン	0.25	0.273±0.006	0.256±0.065	5	8	9
レッドピーマン	ダイアジノン	0.1	0.099±0.004	0.090±0.023	6	9	9
	ジメトエート	0.4	0.445±0.019	0.441±0.118	5	9	9
	シベルメトリン	0.8	0.812±0.035	0.748±0.267	7	9	9
野菜ジュース	ジメトエート	0.4	0.387±0.023	0.423±0.069	8	8	9
	クロルピリホス	0.4	0.391±0.018	0.355±0.070	9	9	8
	EPN	0.1	0.097±0.008	0.087±0.014	8	8	9
	シベルメトリン	0.5	0.521±0.045	0.449±0.087	9	9	8
ジャガイモ	クロルピリホス	0.2	0.205±0.011	0.170±0.032	8	9	8
	マラチオン	0.1	0.112±0.005	0.085±0.029	8	8	8
	プロチオホス	0.1	0.109±0.006	0.076±0.015	5	9	9
	フェンバレレート	0.05	0.045±0.009	0.048±0.027	5	8	8

QuEChERS 法を活用した残留農薬分析法の検討

○高取 聡、起橋雅浩、北川陽子、岡本 葉、柿本幸子、
村田 弘、住本建夫、田中之雄
大阪府立公衆衛生研究所

【はじめに】

食品衛生法の一部が改正され、残留農薬の分野では、ポジティブリスト制が導入された。これに伴って多数の項目について広範囲に分析することが求められている。限られた時間と労力でこの要求に対応するためには、簡便で迅速な一斉分析法が有効である。我々は、QuEChERS 法を活用した簡易分析法の検討を行ってきた (1-3)。本法の特徴は、ポリプロピレン (PP) 製遠心管中でアセトニトリル抽出ならび塩析・脱水を行い、遠心分離によって迅速に抽出液を得ることである。これによって、分析に要する時間ならびに労力等の軽減に成功している。昨年の本研究会では、GC/MS 及び GC-FPD を用いた分析法を報告した。今回、LC/MS/MS を用いた分析法を検討したので報告する。

【試薬等】

標準品は、和光純薬、関東化学、林純薬、Riedel de Haen 及び Dr. Ehrenstrofer G.m.b.H. より購入した。標準品は、アセトンまたはメタノールに溶解し、1,000 ppm 溶液を作成し、適宜、混和して用いた。アセトニトリル、トルエン、メタノール、アセトン及び塩化ナトリウムは、残留農薬分析用 (和光純薬) を用いた。無水硫酸マグネシウムは、特級 (和光純薬) を用いた。精製用カラムには、Spelclean ENVI-CarbII/PSA (500/500 mg; SPELCO) 及び Spelclean ENVI-18 (500 mg; SPELCO) を用いた。抽出用遠心管として BLUE MAX 50 mL ポリプロピレンコニカルチューブ (Becton Dickinson) を用いた。ホモジナイザーは、Polytoron PT10 (KINEMATICA) を用いた。遠心分離機は、Himac SCR 20B (日立製作所) を用いた。

【装置】 タンデム型質量分析器付高速液体クロマトグラフ (LC/MS/MS)

LC: 1100 Series (Agilent)

カラム: ASCENTIS C18, 2.1 x 100 mm, 3 μ m (SPELCO)

移動相 : (A) 0.1% ギ酸水溶液 (B) 0.1% ギ酸含有メタノール溶液
グラジエント (B) 20→95% (12 min; linear) →95% (8 min, Hold)

流速：200 μ L/min カラム温度：40°C 注入量：5.0 μ L

MS/MS: API 3000 (Applied Biosystems)

インターフェイス/モード：ESI/ポジティブ

キャピラリー電圧/温度：4000 V/450°C

測定条件の最適化は、各標準溶液を 0.1%ギ酸含有 50%メタノール溶液で 0.1~0.5 ppm になるように希釈したものをインフュージョンで導入し、Analyst™ 1.3.2 で最適化した。分析及び定量は、Multiple Reaction Monitoring で行った。

【方法】

【野菜・果実】フードプロセッサーで均一化した試料 10 g を PP 製チューブに採取し、アセトニトリル 20 mL を加えて、ホモジナイザーで 1 分間攪拌抽出した。これに予め秤量しておいた塩化ナトリウム 1 g 及び無水硫酸マグネシウム 4 g を加えて直ちに 1 分間振とう攪拌した。次に遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) を行い、およそ 16~18 mL のアセトニトリル相を得た。このアセトニトリル相 8.0 mL をアセトニトリル/トルエン (3/1) 混液 30 mL でコンディショニングした ENVI-Carb II/PSA (500/500 mg; グラファイトカーボンブラック/PSA 積層カラム) に負荷し、アセトニトリル/トルエン (3:1) 混液 30 mL で溶出した。負荷した際の通過液及び溶出液を 100 mL ナス型フラスコに捕集し、減圧濃縮した (40 °C 以下)。窒素気流下で乾固後、メタノールで溶解し、2.0 mL に定容した。これを MilliQ 水で 4 倍に希釈して試験液とした (スキーム 1)。

【穀類】フードプロセッサーまたはミルで均一化した試料 5.0 g を PP 製チューブに採取し、MilliQ 水 5.0 mL を加えて室温で 30 分間放置した。これにアセトニトリル 20 mL を加えて、ホモジナイザーで 1 分間攪拌抽出した。次に塩化ナトリウム 1 g 及び無水硫酸マグネシウム 4 g を加えて直ちに 1 分間振とう攪拌した。続いて遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) を行い、およそ 12~16 mL のアセトニトリル相を得た。脂質を除くため、C18 カラムを精製過程に追加した。すなわち、アセトニトリル 10 mL でコンディショニングした ENVI-18 (500 mg) 及びアセトニトリル/トルエン (3/1) 混液 30 mL でコンディショニングした ENVI-Carb II/PSA (500/500 mg) を連結して使用した。このカラムにアセトニトリル相 10 mL を負荷し、はじめにアセトニトリル 10 mL で溶出した。次に上位に連結していた ENVI-18 を除き、ENVI-Carb II/PSA をアセトニトリル/トルエン (3/1) 混液 30 mL で溶出した。負荷した際の通過液及び溶出液を 100 mL ナス型フラスコに捕集し、減圧濃縮した

(40 °C以下)。窒素気流下で乾固後、1.25 mL のメタノールで溶解し、MilliQ 水で 5.0 mL に定容して試験液とした (スキーム 2)。

【添加回収試験】

PP 製チューブに採取した試料に下記の分析対象農薬 (107 種類) を 0.020 または 0.10 ppm になるように添加し、30 分間放置した後、分析を開始した。

Acephate	Acetamipride	Acetochlor	Alachlor
Aldicarb	Allethrin	Atrazine	Azoxystrobin
Bendiocarb	Benfuresate	Bensulide	Benzyladenine
Bitertanol	Bromobutide	Bupirimate	Buprofezin
Cafenstrole	Carbary	Carbofuran	Carfentrazone-ethyl
Chlorpropham	Clethodim	Clomeprop	Cumyluron
Cyanazin	Cycloxydim	Cyflufenamide	Cyhalofop-butyl
Daimuron	Dichlorvos	Diethofencarb	Difenoconazole
Diflubenzuron	Diflufenican	Dimepiperate	Dimethametryn
Dimethoate	Dimethomorph	Diphenamide	Esprocarb
Ethiofencarb	Ethofumesate	Etobenzanid	Fenalimol
Fenbuconazole	Fenobucarb	Fenoxaprop-ethyl	Fenoxycarb
Fenpropimorph	Flufenoxuron	Flusilazole	Furathiocarb
Hexaconazole	Hexaflumuron	Imazalil	Imibenconazole
Inabenfide	Indanofan	Iprodione	Iprovalicarb
Isoprocarb	Isoprothiolane	Isoxathion	Lufenuron
Mefenacet	Mepanipyrim	Metalaxyl	Methabenzthiazuron
Methamidophos	Methomyl	Metolcarb	Molinate
Monocrotophos	Napropamide	Omethoate	Oxamyl
Pacrobutrazole	Penconazole	Pencycuron	Pentoxazone
Phenmedipham	Phoxim	Pirimicarb	Pretilachlor
Prochloraz	Procymidone	Propamocarb	Propiconazole
Propoxur	Propyzamide	Pyriproxyfen	Pyroquilon
Quinoclamine	Quizalofop-ethyl	Tebfenpyrad	Tebuconazole
Tebufenozide	Teflubenzuron	Thenylchlor	Thiabendazole
Thiacropride	Thiobencarb	Triadimefon	Triadimenol
Tri-allate	Trichlamide	Triflumizole	

【定量】

ブランク抽出液を添加した検量線を用いて定量した。すなわち、分析対象農薬のメタノール溶液とブランク抽出液(メタノール溶液)とを1:1で混和した後、MilliQ水で4倍希釈して検量線の作成に用いた。

【結果及び考察】

野菜または果実(ほうれん草、キャベツ、ジャガイモ、オレンジ、リンゴ)及び穀類(玄米及び大豆)を用いて添加回収試験を行った結果の概要を表1及び2に示した。

(野菜・果実)

評価対象とした107種類の農薬のうち、0.020 ppmの添加回収試験で82-94種類の農薬で各作物中からの平均回収率が、70~120% (RSD <20%)となった。また、0.10 ppmの添加回収試験で89-100種類の農薬で各作物中からの平均回収率が、70~120% (RSD <20%)となった。

(穀類)

評価対象とした107種類の農薬のうち、0.020 ppmの添加回収試験で玄米では89種類、大豆では68種類の農薬で平均回収率が、70~120% (RSD <20%)となった。また、0.10 ppmの添加回収試験で玄米では93種類、大豆では99種類の農薬で平均回収率が、70~120% (RSD <20%)となった。

【結論】

QuEChERS法を活用した分析法を用いて代表的な野菜・果実ならびに穀類に対する添加回収試験を実施した。その結果、68-100種類の農薬に対して0.020-0.10 ppmの範囲で良好な回収率を得た。本法について、均一化した試料からLC/MS/MS分析に供する試験液の調製に要する時間は、10検体程度につき、およそ2-3時間であった。前回報告した、GC/MS及びGC-FPDを用いた分析系と組み合わせることによって、広範囲な試料に対して適用できる、簡便かつ迅速な一斉分析法を構築できるものと期待される。

【文献等】

- (1) 起橋ら、第27回農薬残留分析研究会講演要旨集 115 (2004)
- (2) 起橋ら、第28回農薬残留分析研究会講演要旨集 90 (2005)
- (3) Okihashi, M, *et al.*, *J. Pestic. Sci.*, **30**, 368 (2005)

表 1. 野菜果実 5 作物における添加回収試験結果の概要 (n = 5)

*: 括弧内の数値は、RSD が 20% を越える農薬数

作物名	添加濃度 (ppm)	< 70%*	70-120%*	< 120%*
ほうれん草	0.020	3 (2)	91 (1)	3 (7)
	0.10	3 (4)	89 (5)	3 (3)
キャベツ	0.020	1 (5)	89 (9)	4 (0)
	0.10	3 (1)	100 (0)	3 (0)
ジャガイモ	0.020	12 (9)	82 (2)	3 (7)
	0.10	4 (5)	95 (1)	1 (1)
オレンジ	0.020	6 (5)	89 (6)	1 (0)
	0.10	1 (4)	99 (2)	1 (0)
リンゴ	0.020	4 (5)	94 (3)	1 (0)
	0.10	3 (2)	99 (1)	2 (0)

表 2. 穀類 2 作物における添加回収試験結果の概要 (n = 5)

*: 括弧内の数値は、RSD が 20% を越える農薬数

作物名	添加濃度 (ppm)	< 70%*	70-120%*	< 120%*
玄米	0.020	6 (5)	89 (2)	3 (2)
	0.10	2 (5)	93 (1)	3 (3)
大豆	0.020	27 (6)	68 (5)	1 (0)
	0.10	2 (6)	99 (0)	0 (0)

分析スキーム 1. (野菜・果実対象)

