

## 文 献

- 1) Yamada, S., Saito, I., Oshima, H., Hayakawa, J. Application of silica gel column chromatography to analysis of PCBs, chlordanes, and organochlorine pesticides in fish and shellfish and meat. *Aichi Eisei Kenkyusho Ho (Rep. Aichi Inst. Pub. Hlth.)*, **46**, 13-21 (1996).
- 2) Ueno, E., Oshima, H., Saito, I., Matsumoto, H. Multiresidue analysis of pesticides in foods using acetonitrile extraction, GPC and mini column cleanup, and dual-column GC-ECD. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **41**, 178-187 (2000).
- 3) Kabashima, Y., Ueno, E., Oshima, H., Ohno, T. Application of gel permeation chromatography and silica gel column chromatography for analysis of PCBs, chlordanes, and organochlorine pesticides in stock farm and marine products. *Aichi Eisei Kenkyusho Ho (Rep. Aichi Inst. Pub. Hlth.)*, **57**, 55-64 (2007).
- 4) Ueno, E., Oshima, H., Matsumoto, H., Saito, I., Tamura, H. Determination of spinosad in vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography with UV and mass spectrometric detection after gel permeation chromatography and solid-phase extraction cleanup on a 2-layered column. *J. AOAC Int.*, **89**, 1641-1649 (2006).
- 5) Ueno, E. Application of dual column GC for pesticide residues analysis in foods. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **47**, J 299-J 304 (2006).
- 6) Erney, D. R., Gillespie, A. M., Gilvydis, D. M., Poole, C. F. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. *J. Chromatogr.*, **688**, 57-65 (1993).
- 7) Ueno, E., Kabashima, Y., Oshima, H., Ohno, T. Multi-residue analysis of pesticides in foods by gas chromatography with micro-electron capture detector. *Aichi Eisei Kenkyusho Ho (Rep. Aichi Inst. Pub. Hlth.)*, **58**, 19-27 (2008).
- 8) 日本植物防疫協会編 (農林水産省消費・安全局農産安全管理課・植物防疫課監修) "農薬要覧 2005" 東京, (社)日本植物防疫協会, 2005.
- 9) 日本植物防疫協会編 (農林水産省消費・安全局農産安全管理課・植物防疫課監修) "農薬要覧 2006" 東京, (社)日本植物防疫協会, 2006.
- 10) Tomlin, C. D. S. ed. *The Pesticide Manual 14th ed.*, UK, British Crop Protection Council, 2005.
- 11) Lesec, J. Flow fluctuations in GPC-viscometry. *J. Liq. Chromatogr.*, **17**, 1011-1028 (1994).
- 12) Ueno, E., Oshima, H., Saito, I., Matsumoto, H., Yoshimura, Y., Nakazawa, H. Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits by gas chromatography/mass spectrometry after gel permeation chromatography and graphitized carbon column cleanup. *J. AOAC Int.*, **87**, 1003-1015 (2004).
- 13) Kakimoto, Y., Ohtani, Y., Funaki, N., Joh, T. Simultaneous determination of pesticide residues in fruits and vegetables by GC/MS (SCAN mode) and HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **44**, 253-262 (2003).
- 14) Kobayashi, H. The approach to pesticide performance in analytical procedure. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **42**, J-331-J-336 (2001).
- 15) 農薬残留分析法研究班編 "最新農薬の残留分析法" 東京, 中央法規出版, 2006, p. 142-144, 189-191. (ISBN 4-8058-2782-3)

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）

「検査機関の信頼性確保に関する研究」

平成 20 年度

研究成果に関する刊行物

学会発表

## Pesticide Analysis in Processed Foods

Okihashi M, Takatori S, Kitagawa Y, Okamoto Y, Obana H, Taguchi S

Osaka Prefectural Institute of Public Health, Nakamichi 1-3-69, Higashinari-ku, Osaka, Japan;  
email okihashi@iph.pref.osaka.jp

In 2008 Feb, it was reported that two varieties of Chinese dumplings (thin dough packet containing ground meat and vegetables, fried before eat) which were laced with pesticide made at least 10 Japanese people ill. It was the first case of food poisoning which was caused by pesticides in imported food. The Japanese distributors quickly recalled these dumplings and other related products made by the same Chinese company. After that, up to 130 ppm of methamidophos was found from recalled frozen dumplings. Moreover, 110 ppm of dichlorvos was found from other lot of dumplings which had been recalled because of stink. A high-ranking government official said, "Judging from the circumstantial evidence, we'd have to think that it's highly likely to be a crime." But this case drove the Quarantine Station and other laboratories to analyze pesticides in the processed food. In Japan, many kinds of frozen ready-to-eat or ready-to-cook foods were imported and sold. For example, cut and boiled vegetables, deep-fried chicken or fish, beef or pork cutlet, hamburger, dumplings, pizza and the like. In spite of Japan's much dependence on food from China, many Japanese people scare.

Until now, analytical services have mainly monitored pesticide residues in raw foods, such as fruits, vegetables, grain and meat because results of processed or mixed food hardly fit to the regulation based on raw commodities. We have proposed the rapid multiresidue method which targeted raw foods. [1,2] In this study, we adapted the method for processed foods and checked recovery. Because processed foods usually contained high amount of fat, ethyl acetate was used to extract pesticides from fat. After centrifugation, extract was evaporated to dryness and reconstituted in hexane to perform hexane-acetonitrile partitioning. The acetonitrile layer was cleaned up by graphitized carbon black and PSA cartridge column. Pesticides were analyzed by GC-FPD, GC-MS(MS) and LC-MS/MS. Targeted LOD of this method was 0.01 $\mu$ g/g for 290 pesticides.

### References

- [1] Okihashi, M.; Kitagawa, Y.; Obana, H.; Tanaka, Y.; Yamagishi, Y.; Sugitate, K.; Saito, K.; Kubota, M.; Kanai, M.; Ueda, T.; Harada, S.; Kimura, Y., *Food* 1 (2007) 101-110
- [2] Okihashi, M.; Takatori, S.; Kitagawa, Y.; Tanaka, Y.; *J. AOAC Int.* 90 (2007) 1165-1179

# PA21 PESTICIDE ANALYSIS IN PROCESSED FOODS

Marahiro Okihashi, Satoshi Taksoni, Yoko Kitagawa, You Okamoto, Hirotsuka Obana, Shuzo Taguchi  
Osaka Prefectural Institute of Public Health, Nakamichi 1-3-69, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan  
E-mail okihashi@iph.pref.osaka.jp

## Abstract

In 2003 Feb, it was reported that two varieties of Chinese dumplings (thin dough parcel containing ground meat and vegetables, fried before eat) which were latest with pesticides made at least 10 Japanese people ill. It was the first case of food poisoning which was caused by pesticides in imported food. The Japanese distributors quickly recalled these dumplings and other related products made by the same Chinese company. After that, up to 130 ppm of methamidophos was found from recalled frozen dumplings. Moreover, 110 ppm of dichlorvos was detected from other lot of dumplings which had been recalled because of drink. A high-ranking government official said, "Judging from the circumstantial evidence, we'd have to think that it's highly likely to be a case." But this case drove the Quarantine Station and other laboratories to analyze pesticides in the processed food. In Japan, many kinds of frozen ready-to-eat or ready-to-cook foods were imported and sold. In spite of Japan's much dependence on food from China, many Japanese people scars.

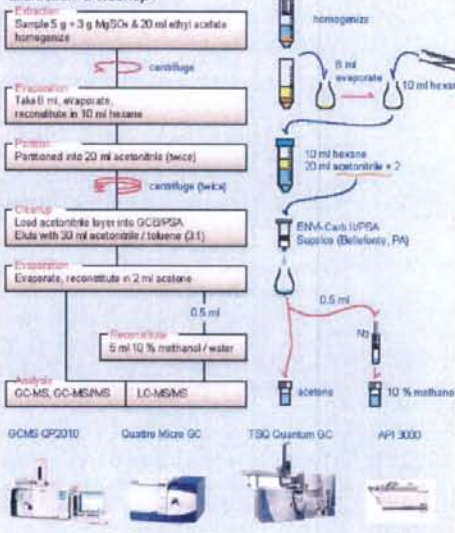
Until now, analytical services have many traditional pesticide residues in raw foods, such as fruits, vegetables, grain and meat because results of processing or raw food hardly fit to the regulation based on raw commodities. We have proposed the rapid multiresidue method which targeted raw foods. [1, 2] In this study, we adapted the method for processed foods and checked recovery. Because processed foods usually contained high amount of fat, ethyl acetate was used to extract pesticides from fat. After centrifugation, extract was evaporated to dryness and reconstituted in hexane to perform hexane-acetonitrile partitioning. This acetonitrile layer was desalted up by granulated carbon black and PSA cartridge column. Pesticides were analyzed by GC-MS/MS and LC-MS/MS. Targeted LOD of this method was 0.01 µg/g for 290 pesticides.

## Outline of food poisoning



About 31,000 ppm of methamidophos was detected from the remains of faced dumpling which victims have eaten.

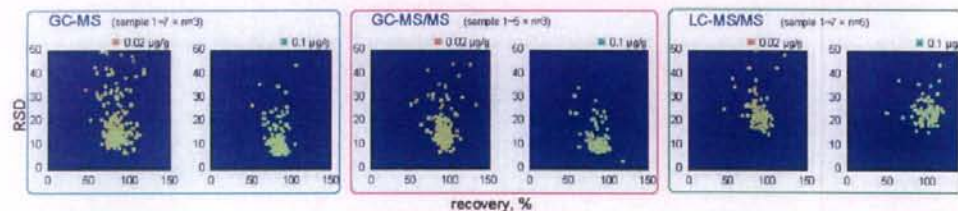
## Extraction & cleanup



## Recovery test

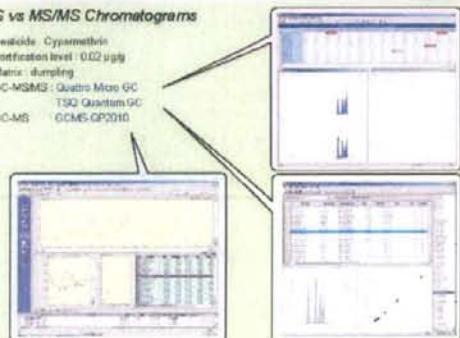
Spike pesticides: GC 263, LO 118, Total 293  
Fortification levels: 0.02 µg/g, 0.1 µg/g

Processed foods: Dumpling, Curry, Potato chips, Fried chicken, Fried fish, Hamburger and Kimpers (air-fried carrot and buckwheat)



## MS vs MS/MS Chromatograms

Pesticide: Cypermethrin  
Fortification level: 0.02 µg/g  
Matrix: dumpling  
GC-MS/MS: Quatro Micro GC  
TSO Quantum GC  
GC-MS: GCMS-QP2010



## Conclusion

Treated processed foods contained about 5-20% of fat. The ethyl acetate extract showed yellow color. After hexane-acetonitrile partitioning, acetonitrile layer became colorless, and final solvent looked clear. Extracts from processed food contained more matrices than raw foods such as fruits, vegetables. Due to the matrices, the GC-MS chromatograms showed many interference peaks. They made target peaks detection difficult. In the case of GC-MS/MS analysis, better reproducibility was observed because of its high sensitivity and selectivity. As for LC-MS/MS analysis, the average pesticide recoveries of each food were widely varied then total RSD was relatively high compare GC analysis. The number of pesticides which indicated >70% of recoveries was: GC 248, LC Total 270. The combination of quick extraction and simultaneous analysis for a large number pesticides enables rapid and efficient monitoring.

## Reference

- Okihashi M, Kitagawa Y, Obana H, Tamaki Y, Yamaguchi Y, Seguchi K, Ito H, Kubota M, Kashi M, Ueda T, Banba S, & Kikawa Y. (2007) *Food L* 101-110
- Okihashi M, Taksoni S, Kitagawa Y, Tamaki Y. (2007) *J. AOAC Int.* 90: 1165-1177

## 加工食品中の残留農薬一斉分析法の開発 (1) - LC/MS/MS を用いた検討 -

大阪府立公衆衛生研究所

○岡本 葉、高取 聡、福井直樹、北川陽子、  
起橋雅浩、村田 弘、住本建夫、尾花裕孝

【目的】2007年12月及び2008年1月に、有機リン系農薬が混入していた中国製輸入冷凍餃子を喫食したことによって、中毒症状を発症する重大な健康被害が発生した。その後、餃子以外の加工食品からも相次いで農薬が検出された。農産物中の残留農薬に対しては、食品衛生法で残留基準が設定されているが、加工食品に対しては一部を除き基準値が設定されていない。加工食品から農薬が検出された場合は、食材の配合比率をもとに残留基準に適合しているか判断する必要があるため、検査されていないのが現状であった。現在、農産物だけでなく、加工食品中の残留農薬も、迅速かつ精度よく測定することが求められている。さらに、加工食品の中には農産物に比べて脂質を多く含むものもあり、農薬の抽出及び測定が困難となることが予想される。そこで、加工食品中の農薬の一斉分析法をLC/MS/MSを用いて検討し、一定の成果が得られたので報告する。

【方法】5種類の加工食品(餃子、レトルトカレー、フライドポテト、鶏肉唐揚げ、白身魚フライ)を検討に用いた。均一化した試料5gをポリプロピレン製遠心管に採取した。無水硫酸マグネシウム3gを加え、酢酸エチル20mLで抽出し、遠心分離後、酢酸エチル層8.0mL(試料2.0g相当)を分取し留去した。抽出物をヘキサンに再溶解し、アセトニトリル/ヘキサン分配法により脂質を除き、回収したアセトニトリル層をグラファイト

カーボン/PSA積層カラムにより精製した。減圧乾固後、アセトンで2mLに定容(GC用試験液)した。このうち0.5mLを窒素気流下で乾固し、25%メタノールで5.0mL(0.1g/mL)としたものをLC/MS/MS用試験液とした。添加回収試験においては、試料に99種類の農薬を20及び100ng/gになるように添加し、同様に抽出した。

### 【分析条件】

LC/MS/MS: APT 3000

イオン化モード: ESI (+)

カラム: ASCENTIS C18, 2.1×100mm, 3µm

カラム温度: 40°C

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) 25→95% (12分間, リニア) → 95% (8分間, 保持)

流速: 200µL/min 注入量: 5.0µL

【結果及び考察】20及び100ng/g両濃度について、それぞれの回収率を求めた。両濃度で良好な結果(回収率, 70-120%; RSD, 20%未満)となった農薬数は、餃子: 72、レトルトカレー: 65、フライドポテト: 32、鶏肉唐揚げ: 86、白身魚フライ: 29であった。これらの項目においては、10ng/gレベルの評価も可能であった。本法を用いて市販の加工食品を分析したところ、1検体から原料のジャガイモに由来すると考えられるクロロプロファムが検出された。

## 加工食品中の残留農薬一斉分析法の開発(2) —GC/MS及びGC/MS/MSを用いた検討—

大阪府立公衆衛生研究所 ○北川陽子、起橋雅浩、高取 聡、岡本 葉、  
福井直樹、村田 弘、住本建夫、尾花裕孝

【目的】2007年12月及び2008年1月に中国製冷凍餃子を原因食品とする有機リン系農薬中毒事件が発生した。この事件以降、加工食品中の残留農薬について懸念が広がっている。

今回、「加工食品中の残留農薬一斉分析法の開発(1)」と同じ前処理方法を用いて、GC/MS及びGC/MS/MSによる加工食品中の残留農薬の一斉分析法の検討を行ったので報告する。

### 【方法】

#### 1. 試料及び前処理方法

「加工食品中の残留農薬一斉分析法の開発(1)」と同様の方法を用いた。

#### 2. 添加回収実験

260農薬を対象に添加回収実験を行った。添加濃度は20及び100 ng/gの2濃度とした(n=3)。

#### 3. 分析条件

##### 1) GC/MS分析条件

装置：Shimadzu GCMS-QP2010  
カラム：Rtx-5ms, 0.25mm×30m, 0.25µm  
注入量：1µL (Splitless)

##### 2) GC/MS/MS分析条件

装置1：  
Waters Micromass Quattro micro GC  
装置2：  
Thermo Fisher Scientific TSQ Quantum GC  
カラム：DB-5ms, 0.25mm×30m, 0.25µm  
注入量：1µL (Splitless)

【結果及び考察】260農薬のうち、感度不足等の理由によりGC/MSの測定可能農薬数は221農薬であった。添加濃度20及び100 ng/gの両濃度で良好な結果(回収率, 70~120%; RSD, 20%未満)となった農薬数を表に示す。

表 2濃度の添加回収実験において良好な結果を得た農薬数

	GC/MS	GC/MS/MS
測定可能農薬数	221	260
餃子	192	234
レトルトカレー	147	214
フライドポテト	176	232
鶏肉唐揚げ	172	237
日食魚フライ	202	243

測定可能農薬数に対する割合は、GC/MSのレトルトカレーを除いて、概ね8割以上であった。下図に5種類の加工食品の平均回収率及びRSDの相関を示す。GC/MS/MSはGC/MSに比べ、RSDが小さい傾向であり、特に20 ng/g添加の結果において顕著であった。

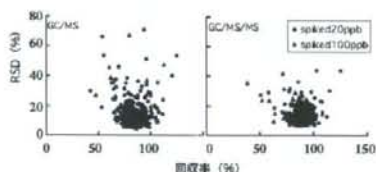


図 5種類の加工食品の平均回収率とRSDの相関

現在、市販の加工食品について、本法を用いた残留農薬の実態調査を行っている。

## 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3報)

○村田 弘<sup>1</sup>、織田 肇<sup>1</sup>、岩上正蔵<sup>1</sup>、田中之雄<sup>1</sup>、尾花裕孝<sup>1</sup>、  
住本建夫<sup>1</sup>、高取 聡<sup>1</sup>、北川陽子<sup>1</sup>、柿本幸子<sup>1</sup>、岡本 繁<sup>1</sup>、  
土田由里子<sup>2</sup>、上野英二<sup>2</sup>、田中敏嗣<sup>3</sup>、宇野正清<sup>4</sup>、木野善夫<sup>5</sup>、  
佐々木珠生<sup>6</sup>、堤 泰造<sup>7</sup>、花田喜文<sup>8</sup>

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

#### はじめに

食品衛生法の改正により約800種類の農薬等に暫定基準または一律基準が設定された。この規制に対応するため検査機関では検査体制を再構築し、農薬検査の拡大を図ってきた。そこで17年度から継続して<sup>1)</sup>検査機関のポジティブリスト制度における一律基準値(10ppb)付近の農薬検査精度の確認ならびに検査結果の信頼性を確保するために地方衛生研究所の9参加機関の協力を得て外部精度管理調査を実施した。

#### 方法

今回の外部精度管理調査の概要を表1に示した。ほうれん草及びとうもろこしのマイクロベスト食料(業務用8kg、株式会社新進)を基材とし、表に示した添加農薬を用いて精度管理試料を調製した。精度管理試料、無添加対照試料、標準混合液を参加協力機関に配布して検査を実施した。検査方法は、各機関で通常行っている検査操作手順書(SOP)に従って実施し、検査回数は5回とした。なお、ほうれん草には3種類の内部標準物質(サロゲート物質)を試料に加えGC/MS測定、とうもろこしはLC/MS/MS測定で行うこととした。また調査試料の最終試験液(1g/mL、大阪府立公衆衛生研究所で調製)を添加農薬名及び添加量をブラインドにして分析機器メーカーに送付し、ほうれん草は農薬データベースを搭載したGC/MS-SCAN測定、とうもろこしはLC/TOF/MS測定を実施した。

精度管理用試料の均一性試験は無作為に5個の小分け試料を選び、各小分け試料から2箇所採取して測定を行った。安定性試験は試料を送付してから2ヶ月後に無作為に5個の小分け試料を測定した。

結果の評価方法は、各機関の報告値を統計処理(基本統計量、Xbar-R管理図、Zスコア等)を行った。

#### 結果及び考察

均一性、安定性を確認したほうれん草、とうもろこしの精度管理試料に、一律基準値付近の低濃度の農薬10種類を添加した結果、全機関が添加農薬をすべて正しく検出した。設定濃度が7~30ppbでフェンプロナゾールを除けば再現性(RSD)は約13%以下と比較的小さく、全体的に検査は精度良く実施されていた。各農薬の全体の平均値から10ppb付近でも良好な結果が得られることが分かった(表2)。Xbar-R管理図、Zスコアによる評価で適正域に入っていない機関も認められたが、総合成績では前年度と比較して良好な結果が得られた機関が多かった。

R管理図で適正域に入っていない機関(RSDが10%を超える)もサロゲート物質を内標準として補正した結果、再現性においてRSDが5%以下となり、安定同位体による補正は、検査精度の維持・向上に効果が高いことが証明された。

GC/MS-SIM、LC/MS/MS-MRM測定の他にGC/MS-SCAN法による解析ソフトウェアやLC/TOF/MS測定によるスクリーニング、定量性の検討を行った結果、農薬標準物質を用いなくてもデータベースや精密質量数から添加農薬及びその濃度を的確に検出し、その有用性が認められた。

参加協力機関の測定感度、添加回収率等の技術情報を相互に公開した結果、GC/MS対象農薬では244農薬(異性体等を含む274種類)及びLC/MS/MS対象農薬180農薬(異性体等を含む189種類)が、検出感度として一律基準値を満足していることが判明した。添加回収率では、農産物28種類(延べ47種類)について延べ352農薬の回収率の良否の情報が得られた。本研究で対象とした農薬以外にポジティブリスト制度における一律基準値を考慮した農薬検査の拡大、検査精度に役立つ知見が得られた。

表1 外部精度管理調査 2007

参加機関	新潟県保健環境科学研究所 愛知県衛生研究所 神戸市環境保健研究所 奈良県保健環境研究センター 和歌山市衛生研究所 広島市衛生研究所 徳島県保健環境センター 北九州市環境科学研究所 大阪府立公衆衛生研究所 (9機関)	
検査方法	厚生労働省一斉分析法(4機関) QuEChERS改良法(2機関) 超臨界流体抽出(SFE)法 愛知県法 兵庫県法	
測定機器	GC/MS	LC/MS/MS
精度管理試料	ほろれん草ベスト	とうもろこしベスト
配布標準混合液	GC/MS用農薬標準混合液 (85種類)	関東化学製農薬標準混合液31 LC/MS/MS用農薬混合液 和光純薬製農薬標準混合液PL-7-1 (30種類)
指定農薬リスト	アザナゾール アセトクロール アトラジン イソホス イソキサチオン イソプロチオラン イプロベホス エチオン エトフェセート オキサジアゾン キントゼン クロルピリホスメチル ジクロホップメチル ジフェナミド シマジン テクナゼン トリアジメホス ナプロバミド ビベロホス フェナミホス フェンプロナゾール フサライド プロフェジン フルアクリルム プロピザミド プロフェノホス プロホキスル プロメトリン $\gamma$ -BHC クロルピリホス ダイアジノン (30種類)	アジンホスメチル アニロホス イプロ/リカルブ インドキサカルブ クロマフェノジド シフルフェナミド シメコナゾール ビリフタリド フェノキサカルブ メトキシフェノジド (10種類)
内部標準物質	$\delta$ -BHC- $^{13}C$ , クロルピリホス-d10 ダイアジノン-d10	
追加農薬	クロルピリホスメチル, ジクロホップメチル, フェンプロナゾール, プロモホス, $\gamma$ -BHC, クロルピリホス, ダイアジノン (7種類)	シフルフェナミド, シメコナゾール, メトキシフェノジド (3種類)

表2 外部精度管理調査結果 2007

試験試料名	添加農薬名	規定濃度 (ppb)	試料調製後の定量化		全参加機関		Xbar管理図 「真行」数	R管理図 「真行」数	Z-スコア 「真行」数
			平均値 (ppb)	再現性 (RSD,%)	平均値 (ppb)	再現性 (RSD,%)			
ほろれん草	クロルピリホスメチル	30	28.4 (3.1)		30.0 (8.7)		9	8	8
	ジクロホップメチル	17	15.6 (3.2)		16.8 (12.5)		9	8	9
	フェンプロナゾール	10	11.1 (5.4)		12.6 (31.2)		7	8	7
	プロモホス	8	8.1 (3.8)		7.5 (8.6)		9	8	9
	$\gamma$ -BHC	15	13.1 (3.7)		13.1 (11.2)		9	8	9
	クロルピリホス	7	7.5 (3.1)		6.9 (12.1)		9	8	9
	ダイアジノン	10	10.1 (3.3)		9.3 (9.2)		9	8	9
とうもろこし	シフルフェナミド	20	20.5 (2.2)		19.5 (9.8)		9	9	9
	シメコナゾール	15	15.4 (3.3)		14.6 (7.5)		9	7	9
	メトキシフェノジド	10	10.4 (5.8)		8.7 (7.4)		9	8	9

## 謝辞

本研究は平成19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)により実施した。本研究にご協力いただいた関係各位に感謝いたします。

## 文献

[1]住本建夫ら:第43回全化協講演集,89-90(2006)

[2]村田 弘ら:第44回全化協講演集,123-124(2007)



## 加工食品中の残留農薬分析

起稿雅浩、北川陽子、高取聡、岡本葉、福井直樹、村田弘、住本建夫、尾花裕孝  
大阪府立公衆衛生研究所

### はじめに

2007年12月から2008年1月にかけて、中国製輸入冷凍餃子を原因食品とした健康被害事件が複数発生した。患者は有機リン系農薬による中毒症状を示したが、それは冷凍餃子中に高濃度で混入されていたメタミドホスが原因であった。この濃度は使用後の残留とは考えられなかったが、これを機に加工食品中の農薬に対する消費者の不安が増大した。また、加工食品は細菌検査は一般的に行われていたが、残留農薬は原材料が食品衛生法で規制されているため、検査が行われていなかった。このため、事件発覚後に多くの加工食品で残留農薬分析が行われ、いくつかの低濃度の検出事例が報告された。現在、農薬分析を行っている機関では、生鮮食品だけでなく加工食品中の残留農薬分析にも対応することが求められている。加工食品の種類は多岐にわたり、様々な種類の物質を含んだ製品の総称である。今回はその成分中に脂質を多く含む食品と、脂質が少ない食品に分けて、これまで生鮮食品で使用していた簡易一斉分析法をもとに、加工食品中の残留農薬の一斉分析法を検討したので報告する。

### 器具、試薬

フードプロセッサ：精米機 QS-7 (東芝)  
ホモジナイザー：HG30 (日立製作所)、PT10-35GT (ポリトロン)  
抽出用遠心管：50 mL コニカルチューブ (Thermo Fisher Scientific、BD Falcon)  
GCB/PSA 固相カラム：Supelco 製 ENVI-Carb II/PSA (500 mg / 500 mg)  
農薬標準品：和光純薬、林純薬、関東化学、Riedel de Haën、Dr. Ehrenstorfer より購入した農薬標準品をアセトンで溶解し、1 mg/mL 液を作成した。これを適宜混合し、GC 用、LC 用に混合溶液を調製した。

### 装置

GC-MS/MS  
装置 1：Quattro micro GC (Waters) (添加回収試験)  
装置 2：TSQ Quantum GC (Thermo Fisher Scientific) (市販品モニタリング)  
インターフェイス：250℃、イオン源：250℃  
イオン化法：EI コリジョンガス：アルゴン

カラム：DB 5ms (J&W) 30m × 0.25mm, 0.25 $\mu$ m キャリアガス：He

注入口：250 $^{\circ}$ C 注入方法：Splitless 注入量：1 $\mu$ L

GC-MS

装置：GCMS-QP2010 (島津製作所)

カラム：Rtx-5ms (Restek) 0.25mm × 30m, 0.25 $\mu$ m キャリアガス：He

注入口：250 $^{\circ}$ C 注入方法：Splitless 注入量：1 $\mu$ L

LC-MS/MS

装置：API 3000 (Applied Biosystems)

イオン化モード：ESI (+)

カラム：ASCENTIS C18 2.1 × 100 mm, 3  $\mu$ m

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：(A) 0.1% 甲酸水溶液 (B) 0.1% 甲酸含有メタノール溶液

グラジエント：(B) 25% (0分) → 95% (12 ~ 20分)

流速：200  $\mu$ L/min 注入量：5  $\mu$ L

#### 前処理方法

##### 1. 脂質含有加工食品

生鮮食品の前処理方法ではアセトニトリルで抽出していたが、アセトニトリルでは脂質中からの抽出能力に懸念があったため、抽出溶媒に酢酸エチルを用いた。また、抽出後に溶媒を置換してヘキサン/アセトニトリル分配を行い、抽出液より脂質を除去した。精製操作としては、これまで実績のあるグラファイトカーボン (GCB) /PSA の固相カラムを用いた。フードプロセッサーで均一化した試料 5g をコニカルチューブにとり、無水硫酸マグネシウム 3g と酢酸エチル 20mL を加えてホモジナイザーで 1 分間攪拌抽出した。その後 3000rpm で 5 分間遠心分離を行い、上清を抽出液とした。この抽出液 8mL (試料 2.0g 相当) をなす型フラスコに分取し、濃縮して溶媒を留去した。残渣をヘキサンに溶解させつつコニカルチューブに移し、液量を約 10mL とした。そこにヘキサン飽和アセトニトリル 20mL を加え、激しく振盪した後に遠心分離を行い、アセトニトリル層を GCB/PSA 固相カラムに負荷した。残ったヘキサン層には再びヘキサン飽和アセトニトリル 20mL を加えて同じ操作を行い、得られたアセトニトリル層を同じ GCB/PSA 固相カラムに負荷した。固相カラムからの通過液は終始同一のなす型フラスコに採取し、さらにアセトニトリル/トルエン (3:1) 30mL で溶出させ、通過液とあわせた。これを 40 $^{\circ}$ C 以下で減圧濃縮後、アセトン 2mL に溶解して GC 用試験液とした。このうち 0.5mL を窒素気流下で乾固し、25%メタノールで 5mL (0.1g/mL) としたものを LC-MS/MS 用試験液とした。

表1 検討農薬結果一覧

GC 測定農薬



GC 測定で不良な結果を示した農薬



LC 測定農薬



LC 測定で不良な結果を示した農薬

Acrinathrin	Fenothiocarb	Piperophos	Bensulide	Acetamidprid
Ametryn	Fenoxanil	Pririmphos-ethyl	Methabenzthiazuron	Curlyfuron
Anilofos	Fenpropathrin	Pririmphos-methyl	Tebufenozide	Daimuron
Azinphos-methyl	Fenthion	Procymidone		Diffubenzuron
Bonalaxyl	Fenvalerate	Profenofos	Acetochlor	Dimethomorph
Benfluralin	Flpronil	Promecarb	Bromobutide	Fenoxypop-ethyl
Benoxacor	Flamprop-methyl	Prometryn	Difenoconazole	Hexaflumazon
BHC	Fluacypyrim	Propachlor	Dimethametryn	Imibenzconazole
Bifenox	Fluxythrinat	Propanil	Dimethoate	Inabenside
Bifenthrin	Fludioxonil	Propaphos	Fenbuconazole	Lufenuron
Bromacil	Flumiclorac-pentyl	Propham	Hexaconazole	Meperipyrin
Bromophos	Flumioxazin	Prothiofos	Indanofan	Methomyl
Bromopropylate	Fluquinconazole	Pyraclifos	Iprovalicarb	Oxaryl
Butachlor	Flutolanil	Pyralufen-ethyl	Isoprotiohan	Pentoxazone
Butafenacil	Flutriafol	Pyrazophos	Pretilachlor	Phenmedipham
Butamifos	Fluvinate	Pyributicarb	Prochloraz	Phoxin
Butasafos	Fosthiazate	Pyridaben	Tebuconazole	Propamocarb
Carbosulfan	Fthalide	Pyridaphenthion		Pyroquilon
Chlorfenapyr	Furametpyr	Pyrifenox	Alachlor	Quazalofop-ethyl
Chlorfenvinphos	Furilazole	Pyrimethanil	Allethrin	Teftuberzuron
Chlorobenzilate	Halfenprox	Pyrimidifen	Atrazine	Thiacropride
Chlorpyrifos	Heptachlor	Pyriminobac-methyl	Azoxystrobin	Trichlamide
Chlorpyrifos-methyl	Hexazinone	Quinalphos	Bendiocarb	
Chlorthal-dimethyl	Hexythiazox	Quinoxifen	Bonfuresate	Isoxathion
Ciodinafop-propargyl	Indoxacarb-MP	Quintozene	Bitertanol	Mefenacet
Clomazone	Iprobenfos	Silafiuofen	Bupirimate	Metalaxyl
Cloquintocet-1	Iprodione	Simazine	Buprofezin	Methamidophos
-methylhexyl	Isazophos	Simeconazole	Cafenstrole	Metolcarb
Cyanophos	Isenphos	Simetryn	Carbaryl	Molinate
Cyfluthrin	Kresoxim-methyl	Sulprofos	Carbofuran	Monochlorophos
Cyhalothrin	Lactofen	Terluthrin	Carfentrazone-ethyl	Napropamide
Cypermethrin	Lenacil	Terbacil	Chlorpropham	Omethoate
Cyproconazole	Malathion	Terbufos	Clome-prop	Pactobutrazol
Cyprodinil	Meprotil	Terbutryn	Cyanazine	Penconazole
DDT	Methactifos	Tetrachlorvinphos	Cyflufenamid	Pencycuron
Deltamethrin	Methidathion	Tetraconazole	Cyhalofop-butyl	Pinimcarb
Diazinon	Methiocarb	Thiazopyr	Diethofencarb	Propiconazole
Dichlofenthion	Methoxychlor	Thifluzamide	Diflufenican	Propoxur
Diclobutrazol	Metolachlor	Toiclofos-methyl	Diphenamid	Propyzamide
Diclofop-methyl	Metominostrobin	Talomeftrin	Esprocarb	Pyriproxyfen
Dicloran	Metribuzin	Triazophos	Ethofumesate	Quinoclamine
Dieldrin	Mevinphos	Tribuphos	Etofenprox	Tebufenpyrad
Dimethenamid	Myclobutanil	Trifloxystrobin	Fenarimol	Tenrychlor
Dimethipin	Nitrothal-isopropyl	Trifluralin	Fenobucarb	Thioencarb
Dimethylvinphos	Northazox	Uniconazole P	Flusilazole	Tri-allyl
Diofenolan	Oxadiazon	Vinclozolin	Furathiocarb	Triadimefon
Dioxabenzofos	Oxadbyl	XMC	Imazalil	Triadimenol
Diphenylamine	Oxyfluorfen	Xylykarb	kopocarb	Triflumizole
Dithiopyr	Parathion			
Edifenphos	Parathion-methyl	Aldrin	Acephate	Fenoxycarb
Endosulfan	Perdimethalin	Allidochlor	Dimepiperate	Fenproprymorph
EPN	Permethrin	Captafol	Ethiofencarb	Flufenoxuron
Ethalfurathin	Phenothrin	Captan		
Ethion	Pienthoate	Cyanofenphos	Endrin	Tecnazene
Ethoprophos	2-Phenylphenol	Dichlorvos	Fensulfotlolan	Tetraclifon
Etofenprox	Phorate	Dicofol	Formothion	Thiabendazole
Etoazole	Phosalone	Diphenyl	Probenazole	Thiometon
Etimfos	Phosmet	Dksulfoton	Propargite	
Fenamiphos	Phosphamidon			
Fenchlorphos	Picolnafen			
Fenitrothion				

判定基準：良好 = 2 濃度共に回収率 70~120%、RSD < 20%  
不良 = 上記以外

## 考察

図1で示すように、GC-MSの測定結果は高濃度添加試験ではGC-MS/MSと類似した散布を示したが、低濃度添加試験ではGC-MS/MSと比較して広範囲の散布になった。これは、加工食品の試料は夾雑物が多く、SIM測定で妨害成分となって低濃度での測定が困難になったためと考えられた。GCのMRM測定ではクロマトグラム上で妨害をうけることはなかったが、一部のフラグメント質量の小さい農薬では、低濃度の測定が困難であった。しかし、GC-MS/MSは今回の試験では良好判定の結果を示した農薬が多く、特に低濃度添加試験において顕著な差を示した。また、LC-MS/MSでは試料液を10倍に希釈して測定していたが、それでもおイオン化抑制/促進効果が見られた。また、そのイオン化抑制/促進効果も対象試料によって大幅に違うため、食品ごとに回収率等を算出しても5種類の加工食品間で大きな差があり、全ての食品を通じて良好な結果を示した農薬は僅かであった。元来加工食品の種類は様々であるため、今回の集計ではその全てを平均し、概要を把握するデータを算出した。その結果、LC-MS/MSでの測定は、図1に示したようにGCに比べて相対標準偏差が増大する傾向が見られた。このことから、LC-MS/MSによる定量値には誤差が大きいと推察されるが、加工食品の残留農薬分析自体がモニタリング目的と考えられるため、残留傾向を把握するためにはこの分析法を使用できると考えられる。もっとも、GCのSIM測定でも夾雑物が多いことから、さらなる精製操作が加われば、より良い結果が得られると考えられる。なお、油脂を含まないその他の加工食品については現在検討中である。

## 市場流通品のモニタリング

大阪府内で入手した冷凍加工食品（餃子、レトルトカレー、シチュー、米飯、野菜加工品等）75品目について測定を行ったところ、ジャガイモ加工食品1検体からクロルプロファミンが0.03～0.04ppm検出された。この値は原料のジャガイモ由来と考えられ、「ばれいしょ」の基準値の千分の一以下であった。今回のモニタリング標本数は多くはないが、この検出率は生鮮食品の検査結果と比較して少なく、食品加工会社の管理、調理過程での消失、また複数素材との混合による希釈等が要因として考えられた。

## まとめ

加工食品に農薬を混入させる事件が相次いで発生し、健康被害事件となったため、加工食品も農薬分析をすべきとの風潮が起きている。しかし、これら食品テロとも言える事件に対して、モニタリング検査では防ぐことはできない。現に10月に発生した冷凍インゲンでは、各流通段階で検査されている。とはいえ分析機関としては、事件発生の際には当該食品を分析する必要に迫られる。本法はそのような有事の際に使用する一斉分析法として有用であると考えられる。

## Analytical method for water-soluble pesticides in animal and fishery products by LC-MS (/MS)

Ueno E, Kabashima Y, Oshima H, Ohno T

Aichi Prefectural Institute of Public Health, Tsuji-machi, Kita-ku, 462-8576 Nagoya, JAPAN  
email [uji\\_ueno@pref.aichi.lg.jp](mailto:uji_ueno@pref.aichi.lg.jp)

In Japan, food poisonings by methamidophos in frozen gyoza imported from China, which is a dumpling with minced pork and vegetable, happened in January, 2008. Methamidophos is a water-soluble pesticide,  $\text{Kow logP} = -0.8$  (20°C). Therefore, we developed a reliable multi-residue method for determining pesticides including water-soluble acephate, methamidophos, demeton-S-methyl, oxydemeton-methyl (demeton-S-methyl sulfoxide) and demeton-S-methyl sulfone in animal and fishery (based) products.

The sample was extracted with water and acetone/n-hexane (2:3) while melting adipose tissue, and centrifuged. The organic layer and aqueous layer were filtered together. After concentration, the extract was loaded with sodium chloride onto EXtrelut NT20 column, and eluted with ethyl acetate. The crude sample extract was concentrated, and cleaned up by the GPC/SPE system. The first GPC pesticide fraction containing lipids and pigments was selectively collected, and loaded directly onto a graphitized carbon/PSA 2-layered column. After the second GPC pesticide fraction was collected, the 2-layered column was eluted with acetone/n-hexane (1:1) automatically. The eluate from the 2-layered column and the second GPC pesticide fraction were combined, and concentrated. The cleaned sample extract in methanol was subjected to ESI-SIM mode LC/MS and/or ESI-MRM mode LC-MS/MS.

Average recoveries (n=5) of pesticides from fortified 12 kinds of animal and fishery (based) products at 0.02 mg/kg ranged from 74% to 107% with RSD values of < 8%.

This method is a reliable tool for determining pesticides in animal and fishery (based) products.

### Reference

Ueno, E., Oshima, H., Saito, I., Matsumoto, H. (2004) *J. AOAC Int.* 87, 1003-1015

Ueno, E., Oshima, H., Matsumoto, H., Saito, I., Tamura H. (2006) *J. AOAC Int.* 89, 1641-1649

## 畜水産食品中デメトン-S-メチルおよび オキシデメトンメチルの分析

愛知県衛生研究所 ○上野英二、梶島由佳、大島晴美、大野 勉

【目的】食品に残留する農薬等のポジティブリスト制度の導入により、畜水産物に対しても農薬成分の基準値が設定された。その上、今年1月に中国製冷凍ギョーザ中メタミドホスによる健康被害が発覚し、複雑なマトリックスを含む“畜水産物を原料とした加工食品”の試験にも耐えうる定量分析法が必要となっている。そこで、メタミドホスと同様に毒性が高く、分析上の問題点が多いデメトン-S-メチルおよびオキシデメトンメチル、それらの酸化生成物であるデメトン-S-メチルスルホンの一斉分析法を検討し、市販の畜水産食品に応用したので報告する。

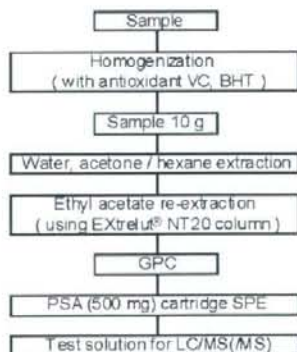
【方法】試料：牛肉、牛レバー、さけ、えび、あさり、鶏卵、牛乳、冷凍食品（ギョーザ、えびシューマイ、ハンバーグ、チキン唐揚げ、白身魚フライ）などを用いた。

試験溶液の調製：島津GPCクリーンアップシステムまたはジーエルサイエンスG-Prep GPC8100を用い<sup>1)</sup>、Scheme 1 に準じて調製した。測定：SIMモードLC/MS 島津LCMS-2010A、およびMRMモードLC/MS/MS 島津Prominence LC/アブライドバイオシステムズAPI4000MS/MSを以下の条件で用いた。

カラム：Capcell Pak C18 AQ (2mm i.d. × 150mm, 3 μm)、カラム温度：40℃、移動相：A液 5mmol/L酢酸アンモニウム水 B液 5mmol/L酢酸アンモニウムメタノール、グラジエント条件：B液濃度 15%→16min→95%→9min→95%→0.01min→15%→14min→Stop、流速：0.2mL/min、注入量：3 μL、イオン化法：ESIポジティブ。

【結果と考察】本法により、水溶性の高いオキシデメトンメチル (log Pow = -0.74, 21℃) などを試料から効率良く一斉に抽出することができた。また、これらの農薬成分はGPCでの溶出が遅いために、試料によっては多量に抽出されてくる脂質や色素成分などを明確に分離（除去）することができた。なお、酸化されやすいデメトン-S-メチル、吸着・熱分解性などを有するオキシデメトンメチルおよびデメトン-S-メチルスルホンを一斉に測定するためにLC/MS(/MS)を用いた。その結果、添加回収率および変動係数は良好であり、いずれの農薬成分も0.01ppmでの定量分析が可能と考えられた。

1) E. Ueno et al., *J. AOAC Int.* **89**, 1641-1649 (2006).



Scheme 1 Sample preparation method

#### LC/TOF-MSによるシクロピアゾン酸の分析

Analysis of cyclopiazonic acid by LC/TOF-MS

○斉藤 貢一<sup>1</sup>, 馬場 奈美季<sup>1</sup>, 岩崎 雄介<sup>1</sup>, 伊藤 里恵<sup>1</sup>, 細江 智夫<sup>1</sup>,  
河合 賢一<sup>1</sup>, 中澤 裕之<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>星薬大)

【目的】シクロピアゾン酸(CPA)は *Aspergillus* 属や *Penicillium* 属の菌が産生するマイコトキシン的一种であり, 肉, ピーナッツ, 卵または飼料中などから検出されている。CPA は体重減少, 下痢および痙攣などの毒性を発現することに加え, 毒性が高いアフラトキシンとの同時汚染が起こることも報告されていることから, CPA やアフラトキシン摂取による健康被害が懸念されている。しかし, 他のマイコトキシンに比べて CPA の分析報告は未だ少ない。そこで本研究では定性能力の高い LC/TOF-MS を用いた CPA の分析法構築を試みた。

【方法】LC/TOF-MS には Waters 社製 LCT Premier XE を用い, 分析カラムには東京化成社製 Dual ODS-AX 10 を, 移動相にはアセトニトリル-ギ酸アンモニウム緩衝液を用いた。TOF-MS におけるイオン化には ESI 法のネガティブイオンモードを採用した。試料には, CPA 産生菌である *Penicillium commune* の菌株を培養した菌体および培養ろ液を用いた。試料からの抽出には有機溶媒による液-液抽出法を, クリーンアップには固相抽出法を用いた。

【結果および考察】CPA のイオン化については, ネガティブイオンモードの方がポジティブイオンモードより高感度に検出されることが分かった。構築した分析法を試料に適用したところ, *Penicillium commune* の菌体と培養ろ液から CPA の存在が疑われるピークが検出され, TOF-MS によって CPA であることを確認した。また, *Penicillium commune* には CPA を産出しない株もあり, 同一種でも菌株によって産生力に差があることが分かった。

# 中国産安全性未審査遺伝子組換え米を対象とした

## 外部精度管理調査における試料作製の検討

(財)食品薬品安全センター  
国立医薬品食品衛生研究所

○井上雪乃, 笠間菊子, 鈴木達也, 大島赴夫  
穂山浩, 中島治, 手島玲子

【目的】平成19年度遺伝子組換え食品検査の外部精度管理調査は、中国産安全性未審査遺伝子組換え(GM)米の検査を対象として実施された。しかし対象とするGM米の入手は不可能であるため、陽性対照プラスミド溶液を非GM米から抽出したコメDNA溶液で希釈して精度管理調査試料を作製する方法を検討した。このうち陽性試料は、全参加機関で陽性と判定される濃度に調整する必要があるため、各検出系について検出下限を検討した。

【方法】①DNA抽出原料および抽出方法の検討: コメ加工品について、検査対象であるGM米混入の有無および非特異的な増幅の有無を通知法<sup>1)</sup>に従い検討した。また、精度管理調査試料の作製には、多量のコメDNA溶液が必要であるため、通知法以外の市販のDNA抽出キットについてもDNAの収量および質を検討した。

②検出下限の検討: ①で選択したDNA抽出原料および抽出方法により得たコメDNA溶液を用い、定性PCR用、リアルタイムPCR用それぞれの陽性対照プラスミド溶液を希釈した。通知法に従い、定性PCRおよびリアルタイムPCRを行い、検出下限について検討した。

【結果と考察】①ピーフン4種および上新粉2種の計6種のコメ加工品から、通知法に従いDNAを抽出した。陽性対照用プライマー対を用いて定性PCRおよびアガロースゲル電気泳動を行った結果、ピーフン1種を除き、いずれも予定長の増幅バンドが確認できた。

増幅バンドが確認できたコメ加工品についてさらにCry1Ac検出用、Btコメ検出用、Btコメ確認用の各プライマー対を用いて定性PCRを行い、検査対象のGM米混入が無いことを確認した。このうち、陽性対照プラスミドのバンドに近接した非特異的増幅バンドが見られず、かつDNA収量が高かった上新粉をコメDNA溶液の抽出原料として採用した。DNA抽出法は、通知法で用いられているGMquicker2(ニッポンジーン)ならびにGenomic DNA Extraction Kit for Food Samples (CARTAGEN)について検討した。それぞれの方法で上新粉からDNAを抽出し、収量および質を比較した。その結果、CARTAGENのキットは、GMquicker2よりDNA収量が高く精製度は同等であったため、CARTAGENのキットを希釈用のコメDNA溶液の調製に使用した。

②陽性対照プラスミド溶液を希釈した試料について、全試行で陽性と判定される1反応あたりのDNAコピー数を検討した。定性PCRではCry1Ac検出用ならびにBtコメ確認用は5コピー、Btコメ検出用は165コピー以上であった。一方リアルタイムPCR法では63Bt系統は750コピー、NNBt系統は80コピー以上であった。これらの結果から、外部精度管理調査試料は、1反応あたりのコピー数として、定性PCRは170コピーならびに8.5コピー、リアルタイムPCRは1500コピーならびに300コピーとなるよう調製した。

1) 食安監発第0220002号 平成19年2月20日