

定長の増幅物が検出された。しかし Bt10 確認用試験では 1 機関の 2 測定で予定長の増幅物が検出できず、この機関を除く 41 機関が Bt10 陽性と判定した。参加機関から報告された DAS59132 の測定結果をまとめて表 6 に示した。陽性対照用試験ではいずれの試料も 38 未満の Ct 値が得られる指数関数的増幅が全参加機関の全測定で認められた。いずれも DAS59132 陰性試料である試料 B、試料 1、試料 2 の DAS59132 検出用試験では全測定で指数関数的増幅は認められず、全参加機関で DAS59132 陰性と判定された。DAS59132 陽性試料である試料 A、試料 3 の DAS59132 検出用試験では、試料 A は全測定で 38 未満の Ct 値が得られる指数関数的増幅が認められた。試料 3 では 1 測定を除き全測定で指数関数的増幅が認められたが、Ct 値が 38 以上となった測定が 10 測定あった。しかし試料 3 の測定のうち実施した 4 測定全てで Ct 値が 38 以上となった機関はなかったため、試料 A、試料 3 とも全機関で DAS59132 陽性と判定された。

以上、1 機関の Bt10 確認用試験における測定を除き、陽性試料においては全て想定通りの結果が得られたため、外部精度管理試料の濃度の設定は適当であったものと考えられた。それとともに、Bt10 陽性コントロールプラスミド溶液および DAS59132 トウモロコシ DNA 溶液について検討した検出下限がいずれも妥当であったことが確認された。

2. 外部精度管理調査結果の検証

2.1 Bt10 の測定

外部精度管理調査の結果、Bt10 陽性試料である試料 1 の Bt10 確認用試験による測定で 2 測定とも予定長の増幅物を検出しなかった機関が 1 か所あった。試料 1 は DNA 溶液試料であるため、この機関の PCR 増幅からアガロースゲル電気泳動の測定条件までを他の機関の条件

と比較検討した。その結果、PCR 酵素に通知に記載の AmpliTaq Gold™ ではなく、TaKaRa Ex Taq® を使用していることが判明した。このため使用した PCR 酵素が測定結果に与える影響を検討することとし、試料 1 について PCR 酵素を変更して Bt10 検出用、Bt10 確認用試験を行った。TaKaRa Ex Taq® は通常品と Hot Start Version があり報告からはどちらを使用したか判明しなかったため、検討した酵素は、TaKaRa Ex Taq® (通常品および Hot Start Version)、Bt10 確認用試験の結果に問題はないが 1 機関が使用していた Platinum® Taq DNA Polymerase と AmpliTaq Gold™ の 4 種とした。なお、TaKaRa Ex Taq® (通常品)を除く他の 3 種は全てホットスタート酵素となっている。その結果、Bt10 検出用試験では、TaKaRa Ex Taq® (通常品)を除くホットスタート酵素の 3 種で n=10 で実施した測定の全てで予定長の増幅物が検出されたが、TaKaRa Ex Taq® (通常品)で予定長の増幅物が検出されたのは 2 測定のみであった(図 2-1)。Bt10 確認用試験においても、同じく TaKaRa Ex Taq® (通常品)を除く 3 つのホットスタート酵素では n=10 で実施した測定の全てで予定長の増幅物が検出された。しかし TaKaRa Ex Taq® (通常品)で予定長の増幅物が検出されたのは 5 測定であった(図 2-2)。また、TaKaRa Ex Taq® (通常品)による増幅では Bt10 検出用試験および Bt10 確認用試験による測定ともに非特異的な増幅が多く認められた。一方、TaKaRa Ex Taq® (Hot Start Version) および Platinum® Taq DNA Polymerase では非特異的バンドが認められる場合があるものの、全測定で予定長の増幅物が検出できた。

以上の結果から、試料 1 を陰性と報告した機関は TaKaRa Ex Taq® (通常品)を使用したと推察され、誤った結果を報告した原因はホットスタート酵素を使用しなかったことにあるものと考えられた。通常の PCR 酵素を用いた PCR では 1 サ

イクル目の昇温過程においてプライマーが鋳型 DNA と非特異的にハイブリッドを形成したり、プライマー同士がハイブリッドを形成したりするため、非特異的増幅物が生じやすい。また通知の Bt10 測定法はホットスタート酵素の使用を前提としているため最初の熱変性の時間が長く設定されており、酵素が失活した可能性も考えられた。これらの理由により、陰性と報告した機関では Bt10 の検出感度が低下したものと考えられた。

2. 2 DAS59132 の測定

1. 4 のリアルタイム PCR 法による DAS59132 の測定において、試料 3 の DAS59132 検出用試験で指数関数的増幅を確認したが Ct 値が 38 以上であった機関が 9 機関あった。そのうち 1 機関は 4 測定のうち 2 測定の Ct 値が 38 以上であった。さらに DAS59132 陽性コントロールの増幅曲線の収束位置が他の機関に比べて低く、Ct 値も他機関に比べ大きかった。アンケート結果からこの機関が DAS59132 検出用試験で使用したプライマーおよびプローブの合成を依頼したメーカーが他の機関とは異なることがわかり、プライマーおよびプローブの精製度または濃度が他機関のものとは少し違った可能性が考えられた。このためプライマー・プローブの濃度に通知の濃度と誤差が生じた場合の影響を DAS59132 陽性コントロールを用いて、DAS59132 検出用試験について検討した。その結果、プライマー・プローブの濃度を通知の 0.75 倍に調製した場合は、通知の濃度の測定結果と比べてサイクル数の後半部分の ΔR_n が低くなり、Th.Line 0.2 における Ct 値は通知の濃度結果よりも約 0.2 高くなった。一方、プライマー・プローブの濃度を通知の 1.25 倍とした場合は、サイクル数の後半部分の ΔR_n が高くなり、Th.Line 0.2 における Ct 値は通知の濃度結果よりも約 0.3 低くなった(図 3)。

当所のリアルタイム PCR 装置を点検した結果、蛍光感度が規定値を下回っていることが判明し、

蛍光感度を上げる調整を行った。以前、リアルタイム PCR 装置の蛍光感度が Ct 値に影響するとの指摘(穂山先生口述)を受けたことがあったため、感度調整後に 4. 1 と同様の測定を行った。その結果感度調整前と比べ、Ct 値が 38 未満となった測定数は 0.025% および 0.0125% 濃度では増加したが、感度調整の影響は顕著ではなかった(表 7)。なお、0.05% 濃度では、感度調整前にはなかった Ct 値 38 以上の測定があるが、これは測定した DAS59132 トウモロコシ DNA 希釈液の調製バッチが同一ではないことによるものと考えられる。ちなみに感度調整後に測定した 0.05% DAS59132 トウモロコシ DNA 希釈液と同一バッチを使用し、感度調整前に実施した均一性および安定性試験では、Ct 値 38 以上の測定が 40 測定中 7 測定と調整後の測定と同程度の頻度で認められた。一方データは示さないが、DAS59132 陽性コントロールの増幅曲線の収束位置は感度調整の前後でほとんど変わらなかった。

以上の結果から、リアルタイム PCR における増幅曲線の収束位置には、リアルタイム PCR 装置の蛍光感度よりもプライマー・プローブの濃度の影響が大きいことが明らかになった。DAS59132 の測定に使用するプライマー・プローブはキットとしては市販されておらず、機関ごとにメーカーに合成を依頼することとなるため、バッチは全て異なっている。このため、メーカーによる差も含め、プライマー・プローブの濃度に誤差が生じやすいと考えられる。今後、DAS59132 の測定用プライマー・プローブがキットとして市販されれば、プライマー・プローブ濃度の機関間の誤差が縮小し、検査精度がさらに向上するものと考えられた。

E. 結論

1. 外部精度管理調査試料の調製

Bt10 および DAS59132 トウモロコシを検査対象とした外部精度管理調査において、調査試料の作製方法を検討した。Bt10 および DAS59132 トウモロコシの組換え DNA を含む DNA 溶液試料を作製するため、Bt10 については Bt10 陽性コントロールプラスミドを、DAS59132 については DAS59132 トウモロコシ DNA 溶液を段階希釈し、対応する検出系における検出下限の検討を行った。その結果、Bt10 陽性コントロールプラスミドでは 4000 倍希釈、DAS59132 トウモロコシ DNA 溶液では 0.05% (2000 倍希釈) が検出下限と考えられたため、これらの濃度の組換え DNA を含む調査試料を作製し、外部精度管理調査を実施した。その結果、Bt10 陽性コントロールプラスミド 4000 倍希釈液 (試料 1) では 1 機関を除く全機関で、DAS59132 トウモロコシ DNA 溶液の 2000 倍希釈液 (試料 3) では全機関で陽性の結果が得られ、検出下限の妥当性が確認できた。

2. 外部精度管理調査結果の検証

外部精度管理調査において、Bt10 陽性試料である試料 1 の測定で、Bt10 を検出しなかった機関があったため、その原因を検討した。その結果、当該機関は PCR 酵素にホットスタート酵素を使用しておらず、そのため誤った結果を報告したことが明らかになった。

また、DAS59132 検出用試験で増幅曲線の収束位置の低下に関与する原因について検討した結果、プライマー・プローブの濃度の影響が大きいことがわかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 Bt10 陽性コントロールプラスミドの検出下限の検討

希釈率	Bt10 検出用試験	Bt10 確認用試験
	検出数 ¹⁾ /測定数	検出数 ¹⁾ /測定数
4000	8/8	8/8
8000	15/16	15/16
16000	6/8	9/16
32000	5/8	3/8

- 1) 予定長の増幅バンドが確認できた測定

表 2 DAS59132 トウモロコシ DNA 溶液の検出下限の検討

希釈率	DAS59132 含量に換算 (%)	検出数 ¹⁾ /測定数
1000	0.1	12/12
2000	0.05	12/12
4000	0.025	5/12
8000	0.0125	0/12

- 1) DAS59132 検出用試験において 38 未満の Ct 値が得られた測定

表 3 DAS59132 陽性コントロールの測定

DAS59132 検出用試験			
DAS59132 陽性コントロール		DAS59132 陽性コントロールの 10 倍希釈液	
Ct 値	判定 ¹⁾	Ct 値	判定 ¹⁾
29.80	+	33.45	+
29.56	+	33.14	+
29.35	+	32.95	+
29.36	+	33.64	+
29.50	+	33.28	+
29.43	+	33.05	+
29.31	+	32.97	+
29.49	+	33.04	+
29.46	+	33.09	+
29.45	+	33.12	+
陽性数/測定数	10/10	陽性数/測定数	10/10

1) Ct 値 38 未満を陽性(+)とした

表 4 外部精度管理調査試料の内容

試料形態	試料名	添加 GMO および含量	
		Bt10(コピー/反応液)	DAS59132(%)
トウモロコシ 粉末試料	試料 A	0	0.1
	試料 B	0	0
DNA 溶液 試料	試料 1 ¹⁾	4.2	0
	試料 2 ²⁾	0	0
	試料 3 ³⁾	0	0.05

- 1) Bt10 陽性コントロールプラスミドの 4000 倍希釈液
- 2) nonGM トウモロコシ DNA 溶液
- 3) DAS59132 トウモロコシ DNA 溶液の 2000 倍希釈液

表 5 外部精度管理調査結果: 定性 PCR による Bt10 の測定

検出系	試料 A		試料 B		試料 1		試料 2		試料 3	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
陽性対照用	84/84	42/42	84/84	42/42	84/84	42/42	83/84	42/42	84/84	42/42
Bt10 検出用	1/84	1/42	2/84	1/42	84/84	42/42	0/84	0/42	2/84	1/42
Bt10 確認用	0/2	0/1	0/2	0/1	82/84	41/42	0/0	0/0	0/2	0/1
陽性判定機関数	0		0		41		0		0	
試料の種類別	Bt10 陰性		Bt10 陰性		Bt10 陽性		Bt10 陰性		Bt10 陰性	
正答率	100%		100%		97.6%		100%		100%	

(1) 検出数/測定数

(2) 検出機関数/実施機関数

表 6 外部精度管理調査結果:リアルタイム PCR による DAS59132 の測定

試験名	試料 A		試料 B		試料 1		試料 2		試料 3	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
陽性対照用	152/152	38/38	152/152	38/38	76/76	38/38	76/76	38/38	76/76	38/38
DAS59132 検出用	152/152	38/38	0/152	0/38	0/152	0/38	0/152	0/38	141/152	38/38
陽性判定機関数	38		0		0		0		38	
試料の種別	DAS59132 陽性		DAS59132 陰性		DAS59132 陰性		DAS59132 陰性		DAS59132 陽性	
正答率	100%		100%		100%		100%		100%	

(1) 検出数/測定数

(2) 検出機関数/実施機関数

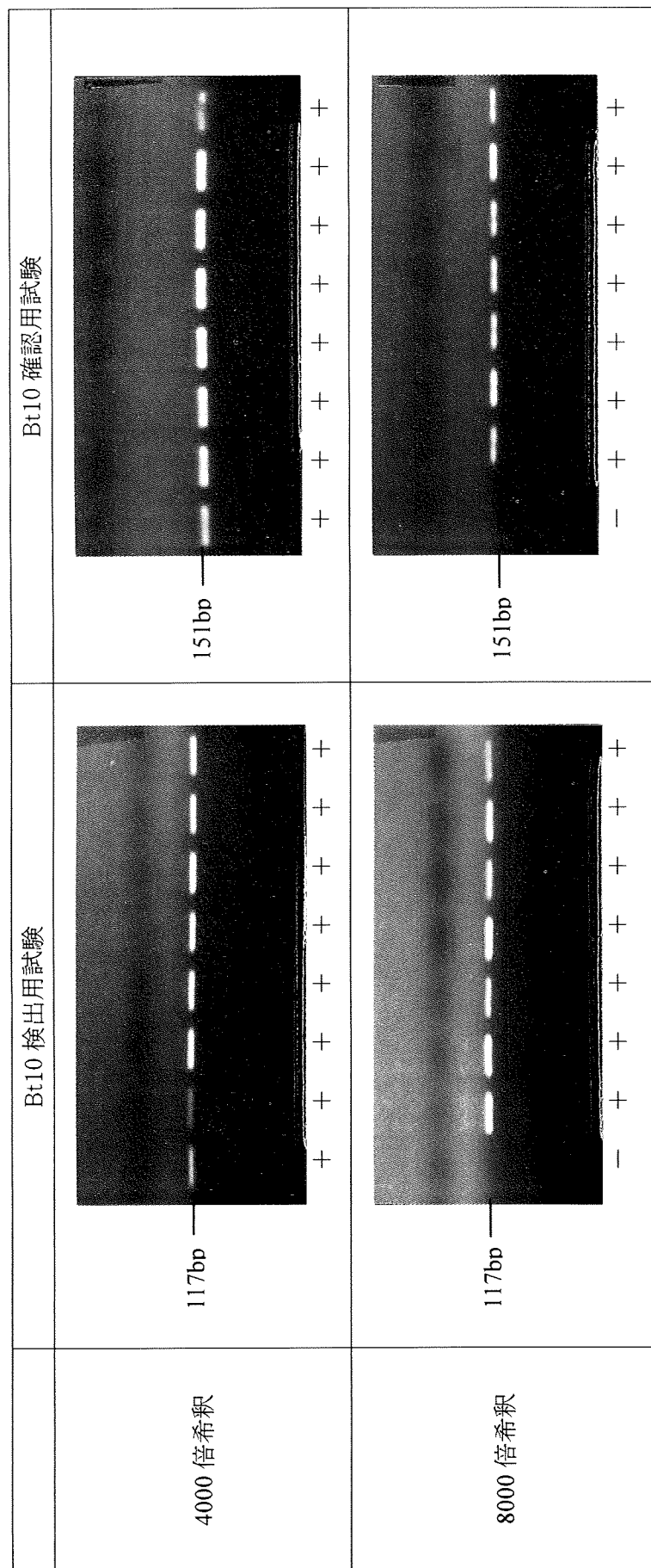
表7 リアルタイムPCR装置の蛍光感度調整前後のDAS59132検出率

DAS59132 含量(%)	DAS59132 検出数 ¹⁾ /測定数	
	蛍光感度調整前	蛍光感度調整後
0.1	12/12	—
0.05	12/12	10/12
0.025	5/12	9/12
0.0125	0/12	2/12

1)DAS59132 検出用試験において 38 未満の Ct 値が得られた測定

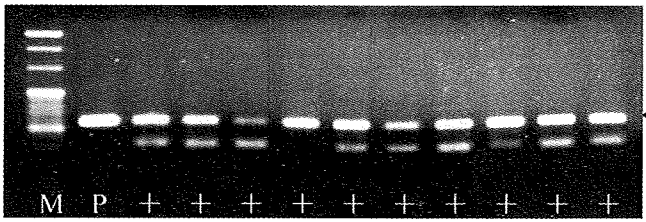
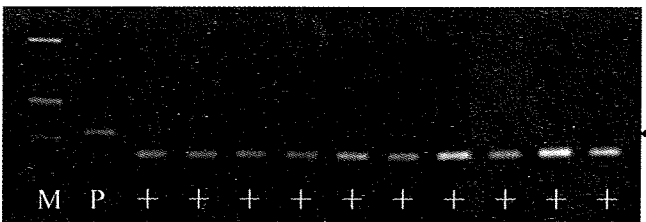
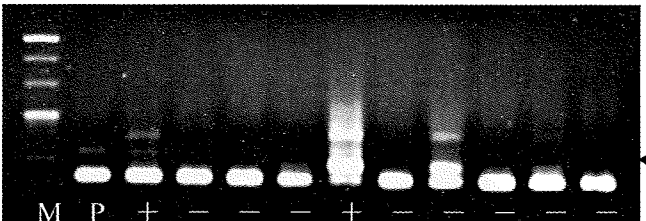
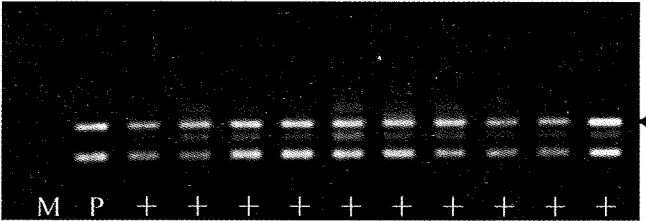


図1 外部精度管理調査試料作製の検討: Bt10 陽性対照プラスミド希釈液の測定



- + 予定長の増幅バンドが確認された反応
- 予定長の増幅バンドが確認されなかった反応

図 2-1 PCR 酵素の種類が測定結果におよぼす影響

PCR 酵素名	メーカー名	Bt10 検出用試験	検出率 ¹⁾
AmpliTaq Gold [®] DNA Polymerase (Hot Start)	ABI		10/10
Platinum [®] Taq DNA Polymerase (Hot Start)	Invitrogen		10/10
TaKaRa Ex Taq [®]	Takara Bio		2/10
TaKaRa Ex Taq [®] Hot Start Version (Hot Start)	Takara Bio		10/10

1) 予定長の増幅バンドが確認できた測定数/測定数

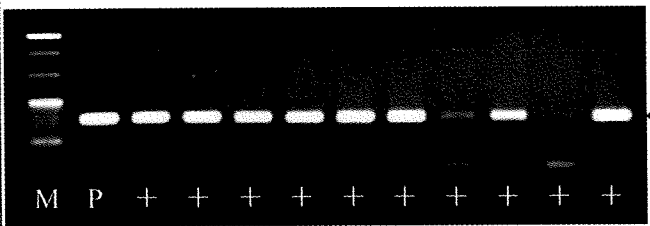
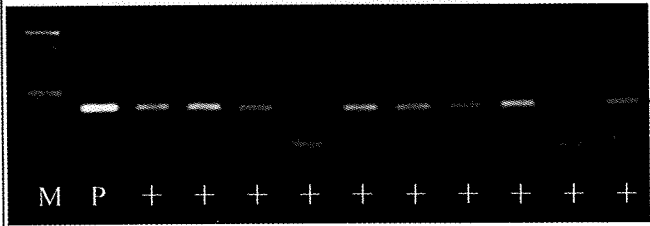
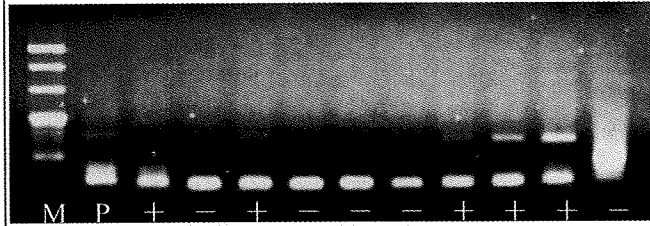
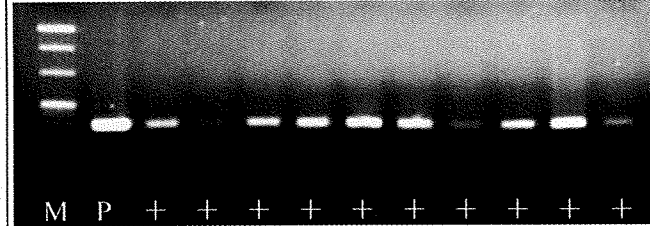
M 分子量マーカー (20 bp ladder)

P 陽性対照プラスミド

◀ 予定長の増幅バンド (117 bp)

+ 予定長の増幅バンドが確認された反応

- 予定長のバンドが確認されなかった反応

PCR 酵素名	メーカー名	Bt10 確認用試験	検出率 ¹⁾
AmpliTaq Gold [®] DNA Polymerase (Hot Start)	ABI		10/10
Platinum [®] Taq DNA Polymerase (Hot Start)	Invitrogen		10/10
TaKaRa Ex Taq [®]	Takara Bio		5/10
TaKaRa Ex Taq [®] Hot Start Version (Hot Start)	Takara Bio		10/10

1) 予定長の増幅バンドが確認できた測定数/測定数

M 分子量マーカー (20 bp ladder)

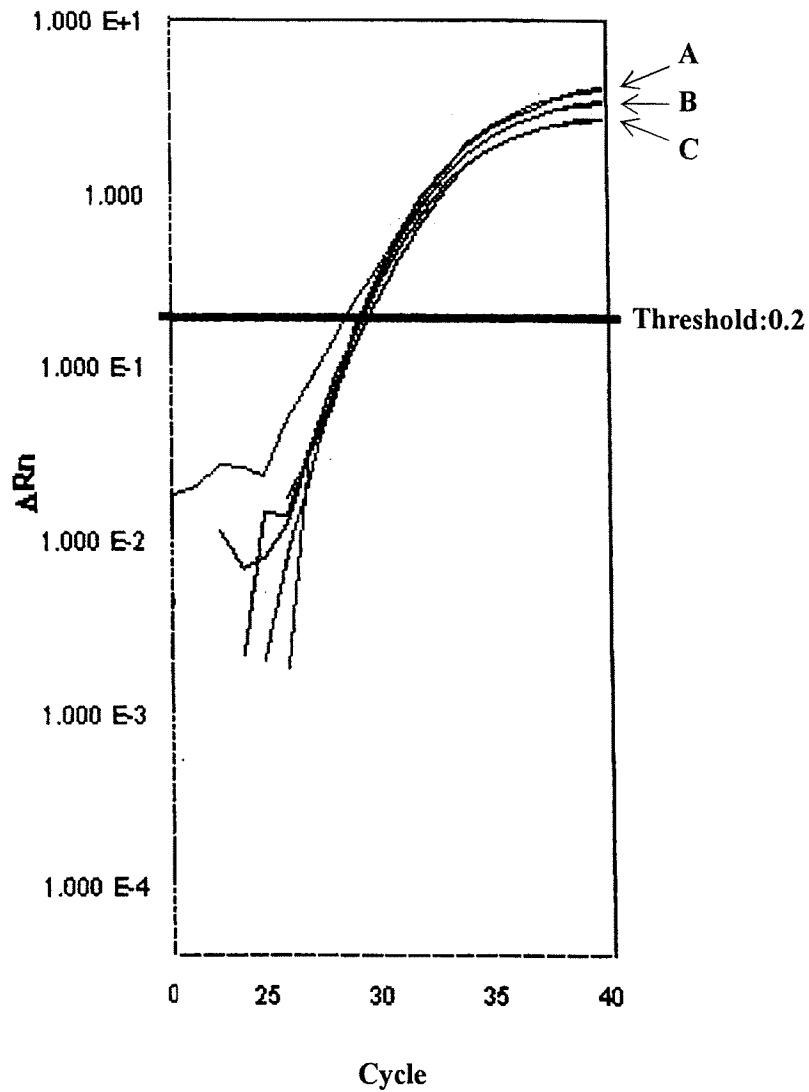
P 陽性対照プラスミド

◀ 予定長の増幅バンド (117 bp)

+ 予定長の増幅バンドが確認された反応

- 予定長のバンドが確認されなかった反応

図3 増幅曲線に対するプライマー・プローブ濃度の影響



	プライマーおよび プローブの濃度	Th. 0.2 における Ct 値
A	1.25 倍	28.99
B	通知の濃度	29.30
C	0.75 倍	29.51

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 21 年度

研究成果に関する刊行物一覧表

研究成果の刊行に関する一覧

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

誌上発表

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
尾花裕孝： 岡本葉、高取聡、北川陽子、起橋雅浩、福井直樹、村田弘、住本建夫、田中之雄（大阪食品衛生協会）、尾花裕孝（大阪府立公衆衛生研究所）	LC-MS/MS による餃子中の農薬一斉分析法の検討	食品衛生学雑誌	Vol. 50	10-15	2009
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（大阪府立公衆衛生研究所）	GC/MS を用いた加工食品中の残留農薬一斉分析法の検討	食品衛生学雑誌	Vol. 50	198-207	2009
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（大阪府立公衆衛生研究所）	GC/MS/MS を用いた加工食品中の残留農薬一斉分析法の検討	食品衛生学雑誌	Vol. 50	243-252	2009
畠山えり子、阿久津千寿子、梶田弘子、菅原隆志（岩手県環境保健研究センター）大阪府立公衆衛生研究所研究協力者	Dispersive SPE を用いた加工食品中の残留農薬迅速一斉分析法の検討	岩手県環境保健研究センター年報	Vol. 8	81-86	2009
小林ゆかり、土田由里子、岩崎奈津美、丹治敏英（新潟県保健環境科学研究所）大阪府立公衆衛生研究所研究協力者	加工食品中の残留農薬分析法の検討	新潟県保健環境科学研究所年報	24	73-77	2009
上野英二、椛島由佳、	LC - MS による農産物中デメトン-S-メチ	食品衛生学雑誌	Vol. 50	64-69	2009

大島晴美、大野勉、根本了、米谷民雄（愛知県衛生研究所）大阪府立公衆衛生研究所研究協力者	ル、オキシデメトンメチルおよびデメトン-S-メチルスルホンの分析				
村山三徳： Sakai, T., Hitomi, T., Sugaya, K., Kai, S., <u>Murayama, M.</u> and Maitani, T.	Determination Method for Ractopamine in Swine and Cattle Tissues Using LC/MS	J. Food Hyg. Soc. Japan	Vol.48	144-147	2007
藤田和弘、仲西亜希子、石原三知代、伊藤裕信、中村宗知、渡井正俊、谷口誠、 <u>村山三徳</u>	LC-MS/MS による畜水産食品中のピコザマイシンの定量	食品衛生学雑誌	Vol. 50	52-57	2009

学会発表

発表者氏名	タイトル名	発表学会名	出版年
尾花裕孝： 起橋雅浩、小阪田正和、内田耕太郎、永吉晴奈、山口貴弘、柿本健作、 <u>尾花裕孝</u> （大阪府立公衆衛生研究所）	加工食品試料を用いた外部精度管理試料調製の検討	第46回全国衛生化学技術協議会年会（岩手）	2009
福井直樹、高取聡、北川陽子、柿本幸子、柿本葉、村田弘、起橋雅浩、 <u>尾花裕孝</u> （大阪府立公衆衛生研究所）	農産物を主原料とした加工食品の残留農薬実態調査	第46回全国衛生化学技術協議会年会（岩手）	2009
<u>島山えり子</u> 、阿久津千寿子（岩手県環境保健研究センター）、梶田弘子（岩手県食肉衛生検査所）大阪府立公衆衛生研究所研究協力者	LC/MS/MS を用いた加工食品中のグルホシネート及び代謝物の同時分析	第32回農薬残留分析研究会（島根）	2009
<u>島山えり子</u> 、阿久津千寿子、青木晴美（岩手県環境保健研究センター）、梶田弘子（岩手県食肉衛生検査所）大阪府立公衆衛生研究所研究協力者	LC/MS/MS を用いた加工食品中のグルホシネートおよびグリホサートの同時分析	第46回全国衛生化学技術協議会年会（岩手）	2009
<u>上野英二</u> 、大野春香、棚橋高志、大島晴美、三上栄一（愛知県衛生研究所）大阪府立公衆衛生研究所	畜水産物中の農薬分析における多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーの応用	日本農薬学会第32回農薬残留分析研究会（島根）	2009

研究協力者			
上野英二、大野春香、棚橋高志、大島晴美、三上栄一（愛知県衛生研究所）大阪府立公衆衛生研究所 研究協力者	畜水産食品中アセフェート、オメトエートおよびメタミドホスの分析	日本食品衛生学会第98回学術講演会（北海道）	2009
大野春香、棚橋高志、上野英二、大島晴美、三上栄一（愛知県衛生研究所）大阪府立公衆衛生研究所 研究協力者	GC- μ ECDによる魚介類中のPCB、有機塩素系農薬及びクロルデン類の一斉分析法の検討	第46回全国衛生化学技術協議会年会（岩手）	2009
苗床江理、山口理香、布川徹、徳崎健史、森下正人（北九州市環境科学研究所）大阪府立公衆衛生研究所 研究協力者	LC/MSを用いた食品中残留農薬等測定における基礎的研究 ～試験液中の水の及ぼす影響～	第46回全国衛生化学技術協議会年会（岩手）	2009
村山三徳： 村山三徳	:残留動物用医薬品の試験法 ポジティブリスト制への対応、	日本食品衛生学会第96回学術講演会	2008. 9. 18
坂井隆敏、村山三徳、根本了、松田りえ子	国産牛中のヒドロコルチゾン含有量実態調査	日本食品衛生学会第97回学術講演会	2009. 5. 14
村山三徳	有害物質とその検査方法および運用について	輸入食品検査検討会	2009. 5. 27

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 21 年度

研究成果に関する刊行物

論文発表

LC-MS/MS による餃子中の農薬一斉分析法の検討

(平成 20 年 7 月 15 日受理)

岡本 葉^{1,*} 高取 聡¹ 北川陽子¹ 起橋雅浩¹ 福井直樹¹
村田 弘¹ 住本建夫¹ 田中之雄² 尾花裕孝¹

Determination of Pesticides in Chinese Dumplings Using
Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

You OKAMOTO^{1,*}, Satoshi TAKATORI¹, Yoko KITAGAWA¹, Masahiro OKIHASHI¹, Naoki FUKUI¹,
Hiroshi MURATA¹, Tatsuo SUMIMOTO¹, Yukio TANAKA² and Hiroataka OBANA¹

¹ Osaka Prefectural Institute of Public Health: 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku,
Osaka 537-0025, Japan;

² Osaka Food Hygiene Association: 2-11-13 Sangenyahigashi, Taisyō-ku,
Osaka 551-0002, Japan; * Corresponding author

A rapid and easy multiresidue method for determination of pesticide residues in Chinese dumplings using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has been developed. Pesticide residues were extracted with ethyl acetate in the presence of anhydrous magnesium sulfate in a disposable tube using a homogenizer. The extract was concentrated and reconstituted in hexane, followed by acetonitrile-hexane partition to remove lipids. The acetonitrile layer was purified with a double-layered cartridge column (graphite carbon black/primary secondary amine silica gel). After removal of the solvent, the extract was resolved in methanol/water and analyzed with LC-MS/MS. Recovery tests of 99 pesticide residues from Chinese dumpling were performed at 20 and 100 ng/g, and 72 pesticides exhibited acceptable recoveries (70-120%) with low relative standard deviations (<20%) at both concentrations. The time for sample preparation with 12 samples to test solutions was approximately 6 hr. This method could be useful for determination of pesticide residues in the Chinese dumplings.

(Received July 15, 2008)

Key words: 農薬 pesticide; 一斉分析法 multi-residue analysis; 餃子 Chinese dumpling; 液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析法 LC-MS/MS; 迅速分析 rapid determination

緒言

わが国において、農産物中に残留する農薬には食品衛生法で残留基準（基準値）が設定されており、検査所および各都道府県の衛生研究所などにおいて市場流通品に対して検査が実施されている。また、検査を効率よく行うため、迅速で簡便な残留農薬一斉分析法が数多く考案され、活用されている^{1)~5)}。しかし、餃子など、複数の食材から加工される食品においては、残留農薬の基準値が設定されていないため、ほとんど検査されていないのが実状であった。こうした状況で、加工食品を対象とした検査を実施する場合、加工食品の中には脂質を多く含むものもあり、残留農薬の抽出および測定が困難であることが考えられる。さら

に、農薬が検出されてもどの食材に起因するか、特定が困難であることが、検査を行う上で問題となる。しかしながら、冷凍餃子をはじめ、加工食品からも有機リン系農薬の検出が相次いで報告されている^{*1)}。食の安全に対する関心が高まるなか、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。

農産物中のメタミドホス分析法については、「アセフェート、オメトエートおよびメタミドホス試験法」が厚生労働省から通知されている。当該分析法では、試料を無水硫酸ナトリウム存在下、酢酸エチルで抽出後、シリカゲルで精製し、ガスクロマトグラフで分析する。また、加工食品における残留農薬については、平成 20 年 2 月 4 日にメタミドホス、3 月 7 日に有機リン系を対象とした分析法

* 連絡先

¹ 大阪府立公衆衛生研究所：〒537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69

² 社団法人大阪食品衛生協会食品検査センター：〒551-0002 大阪市大正区三軒家東 2-11-13

*1 しめさば・肉まんから検出 (<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/02/h0219-3.html>),

冷凍食品から検出 (<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/02/h0220-3.html>)

が厚生労働省から示された*2。しかしながら、加工食品における残留農薬一斉分析法が構築されるまでには至っていない。松本らにより提案されている加工食品原材料における簡易前処理法⁶は、加工食品に適用するには精製が不十分であり、多検体を分析する際には、分析機器への悪影響が危惧される。そこで、分析時に妨害となりうる脂質などの成分の除去に重点をおき、精製方法を改善することが必要と考えられる。

今回、著者らは、餃子中の残留農薬の一斉分析法として、酢酸エチルで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配法および固相抽出によって精製し、LC-MS/MSで分析する方法を考案した。対象農薬は、LC-MS/MSを用いた農産物中の残留農薬一斉分析法の検討⁷の際に選択した99農薬に準じた。この99農薬は、GC/MSで測定が困難な農薬を含む、LC-MS/MSで高感度に測定可能な農薬を中心とした。また、同法を用いて市場流通商品の実態調査を行ったので、併せて報告する。

実験方法

1. 試料

国産の冷凍餃子をフードプロセッサーにより細切均一化して使用した。使用に先立って評価対象とする農薬が含まれないことを確認した。本品は、試験まで -20°C で保存した。実態調査を行うにあたり、国内に流通している冷凍、チルドおよびレトルト食品を大阪府内の食品販売店から入手した。これら実態調査用試料についても、同様に細切均一化し、今回構築した分析方法を用いて定量分析を行った。

2. 試薬

標準品は、残留農薬分析用標準品もしくはその同等品を和光純薬工業株式会社(大阪)、関東化学株式会社(東京)、林純薬工業株式会社(大阪)、Riedel-de-Haën(Seelze, Germany)およびDr. Ehrenstorfer GmbH(Augsburg, Germany)から購入して用いた。各農薬標準品をアセトンに溶解して $1,000\ \mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した。これらを混合し、アセトニトリルで $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ になるように、農薬標準混合溶液を調製した。これを適宜メタノールで希釈して添加回収試験および検量線の作成に用いた。

酢酸エチル、アセトニトリル、アセトン、ヘキサン、トルエンおよびメタノールは、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、特級を用いた(和光純薬)。ギ酸は、HPLC用を用いた(和光純薬)。グラファイトカーボン/PSA積層カラムカートリッジは、Supelco(Bellefonte, PA, USA)社製のENVI-CarbII/PSA(500/500 mg)を用いた。

3. 装置

フードプロセッサー: SQ-7(東芝)

高速ホモジナイザー: ポリトロンPT10(KINEMAT-

ICA, Littau-Lucerne, Switzerland)

遠心分離器およびローター: himacSCR20BおよびR12A5(日立)

LC-MS/MS: LC, 1100 Series (Agilent); MS/MS, API 3000 (Applied Biosystems)

4. 測定条件

4.1 HPLC条件

カラム, ASCENTIS C18, $2.1 \times 100\ \text{mm}$, $3\ \mu\text{m}$ (Supelco); 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; グラジエント条件, (B) $25 \rightarrow 95\%$ (12 min, リニア) $\rightarrow 95\%$ (8 min, 保持); 流速, $200\ \mu\text{L}/\text{min}$; 注入量, $5.0\ \mu\text{L}$

4.2 MS条件

イオン化法: ESI(+), 分析モード: MRM, イオンスプレー電圧: $4.0\ \text{kV}$; イオン源温度: 450°C ; 評価対象農薬(99種類)および測定条件はTable 1に記した⁷。

5. 実験操作

Scheme 1に概要を示した。均一化した餃子 $5.0\ \text{g}$ をポリプロピレン(PP)製遠心管に採取した。これに酢酸エチル $20\ \text{mL}$ および無水硫酸マグネシウム $3\ \text{g}$ を添加して、高速ホモジナイザーで30秒間ホモジナイズした。遠心分離後、酢酸エチル層 $8.0\ \text{mL}$ (試料 $2.0\ \text{g}$ 相当)を $100\ \text{mL}$ ナス型フラスコに分取し、減圧濃縮した。窒素気流下で一定重量に安定するまで乾固した。これをヘキサン $10\ \text{mL}$ に溶解してPP製遠心管に移し、ヘキサン飽和アセトニトリル $20\ \text{mL}$ を加えて1分間振とう攪拌した。遠心分離後、アセトニトリル層をあらかじめアセトニトリル-トルエン(3:1)混液でコンディショニングしたENVI-CarbII/PSAカラムに負荷した。残ったヘキサン層に再度ヘキサン飽和アセトニトリル $20\ \text{mL}$ を加えて1分間振とう攪拌し、遠心分離後、アセトニトリル層を再度ENVI-CarbII/PSAカラムに負荷した。カラムは、アセトニトリル-トルエン(3:1)混液 $30\ \text{mL}$ で溶出した。負荷時の通過液および溶出液は、すべてナス型フラスコに回収し、減圧濃縮した。窒素気流下で乾固し、メタノールで $2\ \text{mL}$ (試料成分換算; $1\ \text{g}/\text{mL}$)に定容した。このメタノール溶液 $2\ \text{mL}$ のうち $0.5\ \text{mL}$ を試験管に採取し、 25% メタノール水溶液で $5.0\ \text{mL}$ (試料成分換算; $0.1\ \text{g}/\text{mL}$)に定容した。

6. 添加回収試験

均一化した餃子に対し、農薬混合溶液($1,000$ または $5,000\ \text{ng}/\text{mL}$; $100\ \mu\text{L}$)を添加し、本法に従って操作し、添加回収率を求めた($n=5$)。

結果および考察

1. 定量下限および検量線

分析対象農薬のうち、フルフェノクスロン、ルフェスロン、ペントキサゾンおよびプロピコナゾールのLC-MS/MS上の定量下限(IQL, instrument quantification limit: シグナル/ノイズ比 >10 で規定)は、 $2.0\ \text{ng}/\text{mL}$ で

*2 <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/dl/080307-1.pdf>