

Fig. 2. MS spectrum of BZM obtained by direct infusion of the standard solution (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

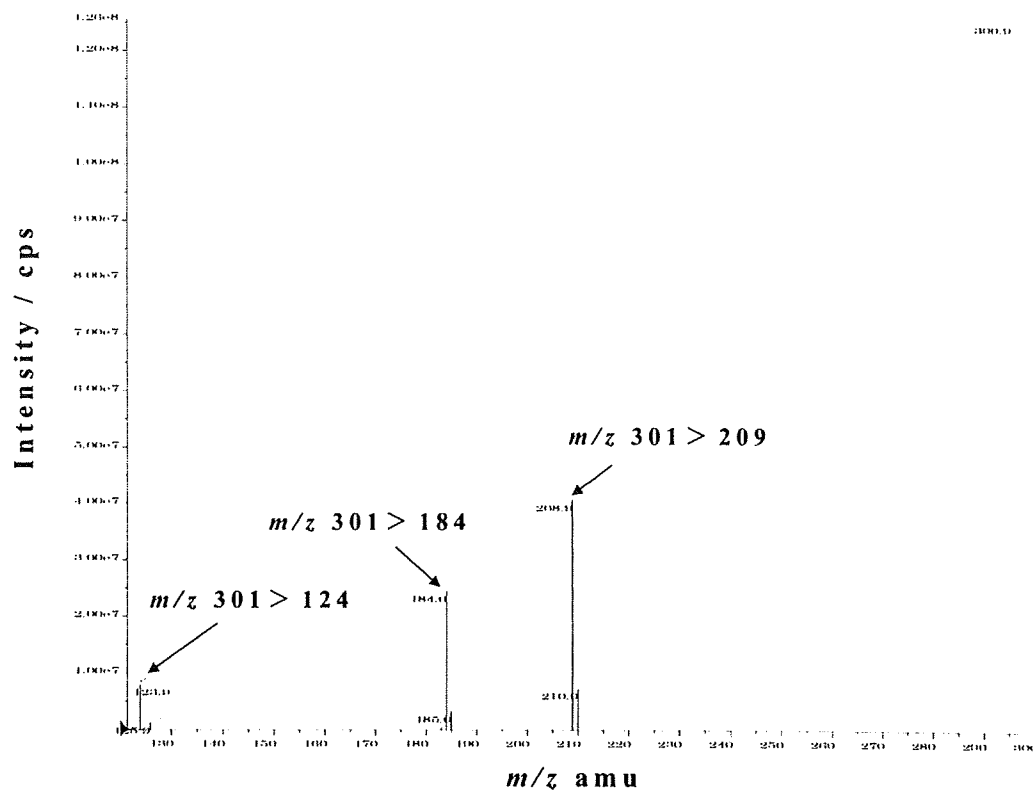


Fig. 3. Product ion scan of BZM, m/z 209, showing the most intense fragment ions at m/z 184 and 124.

1.2 LC 条件の検討

BZM は非常に極性が高く、ODS 系カラムへの保持が弱い。そのため、Ise らは、過塩素酸溶液やリン酸二水素カリウム溶液にほとんどメタノールなどの有機溶媒を加えない移動相を使用している²⁾。ODS 系以外のカラムとして、極性物質に対して保持能力が良いとされる HILIC 系カラムの一種である Inertsil Diol について検討したが、良好な結果が得られなかった。そこで ODS 系カラムでの測定条件を検討した。

分析カラムとして、水の割合が多い移動相において耐久性が高い、Hydrosphere C18 H-301-3 を使用し、BZM の保持を向上させるため、内径 4.6 mm、長さ 100 mm の通常の HPLC で汎用されるカラムサイズとした。また、移動相に用いる有機溶媒として、保持が比較的良好であったメタノールを選択した。

次に、移動相に加える揮発性の酸として酢酸、ギ酸を、添加剤として酢酸アンモニウム、ギ酸アンモニウムを用いて、ピーク形状、検出感度に及ぼす影響を調べた。その結果、0.01% のギ酸を加えることにより、最も良好な感度を得られ、ピーク形状も良好であった。したがって、移動相には 0.01% ギ酸-メタノール系を用いることとした。BZM は、0.01% ギ酸-メタノール (80:20) でピーク形状、感度とも良好に測定可能であったが、試料が豚肝臓の場合、マトリックスの影響によるイオン化抑制が残留基準値濃度 (0.2 µg/g) の添加回収実験の回収率として、30% 程度認められた。通常、イオン化抑制を回避する方法として、グラジエント溶出が用いられるが、BZM は ODS 系カラムへの保持が弱いため、グラジエント溶出の条件設定が困難であった。そこで、最初の数分間 0.01% ギ酸のみを通液し、その後 0.01% ギ酸-メタノール (80:20) に切り替えて通液して BZM を溶出させる手法を検討した。その結果、10 分間 0.01% ギ酸を通液させてから BZM を溶出させた場合、前述の添加回収実験の回収率として、約 20% のイオン化率の改善が見られた。よって、本条件で測定を行うこととした (Table 2)。また、定量用イオンを用いて、本条件で検量線を作成したところ、0.5~25 ng/mL の範囲で良好な直線性 ($R^2=0.999$) が得られた。なお、確認イオンとして用いた m/z 301 > 184 および m/z 301 > 124 においても同様の濃度範囲で良好な直線性 ($R^2=0.999$) が得られた。

2. 前処理法の検討

BZM の残留分析の前処理法としては、斉藤らは、各種の固相抽出カートリッジ、吸着樹脂を検討した結果、XAD-2 樹脂および XAD-4 樹脂にのみ BZM が吸着し、より吸着能が高かった XAD-4 樹脂を採用している¹⁾。しかしながら、当時は XAD-4 に該当するスチレンジビニルベンゼン共重合体などのポリマー系カートリッジが存在しなかったことから、本研究においては、操作性を考慮して、現在汎用されている、ポリマー系カートリッジについて BZM の挙動を確認することとした。

Table 3. Comparison of recovery of BZM from various SPE cartridges

Cartridge	Recovery* (%)
Oasis HLB (60 mg)	<5.0
Oasis HLB (200 mg)	9.2
GL-Pak PLS-2 (270 mg)	39.0
GL-Pak PLS-2 (500 mg)	84.0
Aqsis PLS-3 (200 mg)	11.6
InertSep Pharma-1 (200 mg)	4.8
InertSep Pharma-2 (500 mg)	46.7

* 10 mL of standard solution of BZM (0.025 µg/mL in water) was applied to the cartridge in duplicate.

Table 4. Effect of volume of water used for washing the GL-Pak PLS-2 (500 mg) cartridge on the recovery of BZM

Volume of water (mL)	Recovery* (%)
5	89.3
10	81.9
20	63.5
50	4.0

* 10 mL of standard solution of BZM (25 ng/mL in water) was applied to the cartridge in duplicate.

Table 5. Elution fraction of BZM from the Oasis HLB cartridge

Elution fraction (mL)	Recovery* (%)
0~2	<5.0
2~4	32.3
4~6	93.5
6~8	103.8
8~10	104.8

* 10 mL of Standard solution of BZM (50 ng/mL in 0.01% formic acid) was applied to the cartridge in duplicate.

25 ng/mL の標準溶液 10 mL (250 ng) を負荷して検討した結果、含窒素ポリマー系カートリッジである Oasis HLB, Aqsis PLS-3, Inertsil Pharma は、BZM の吸着は弱く、XAD-4 と同様のスチレンジビニルベンゼン共重合体カートリッジである GL-Pak PLS-2 の方が BZM は強く吸着されていた (Table 3)。しかしながら、充填量の差が大きく回収率に影響していることから、GL-Pak PLS-2 も水溶液中で不可逆的な吸着をしているものとは考えられなかった。そこで次に、上記と同様に GL-Pak PLS-2 (500 mg) を用いて、水洗の容量の違いによる BZM の回収率を調べた。その結果、水洗の容量が増すにつれて回収率が低下していることから、BZM の十分な回収を得るには、5 mL の水洗で行う必要があるものと示唆された (Table 4)。

これらの結果に基づいて、豚肝臓を用いて精製効果を確認した。なお、抽出は、カートリッジに負荷する際に濃縮する必要があることから、Ise らの方法²⁾に準拠して含水アセトニトリルを用いることとした。その結果、1.2 LC 条件の検討において記述したように、移動相条件を検

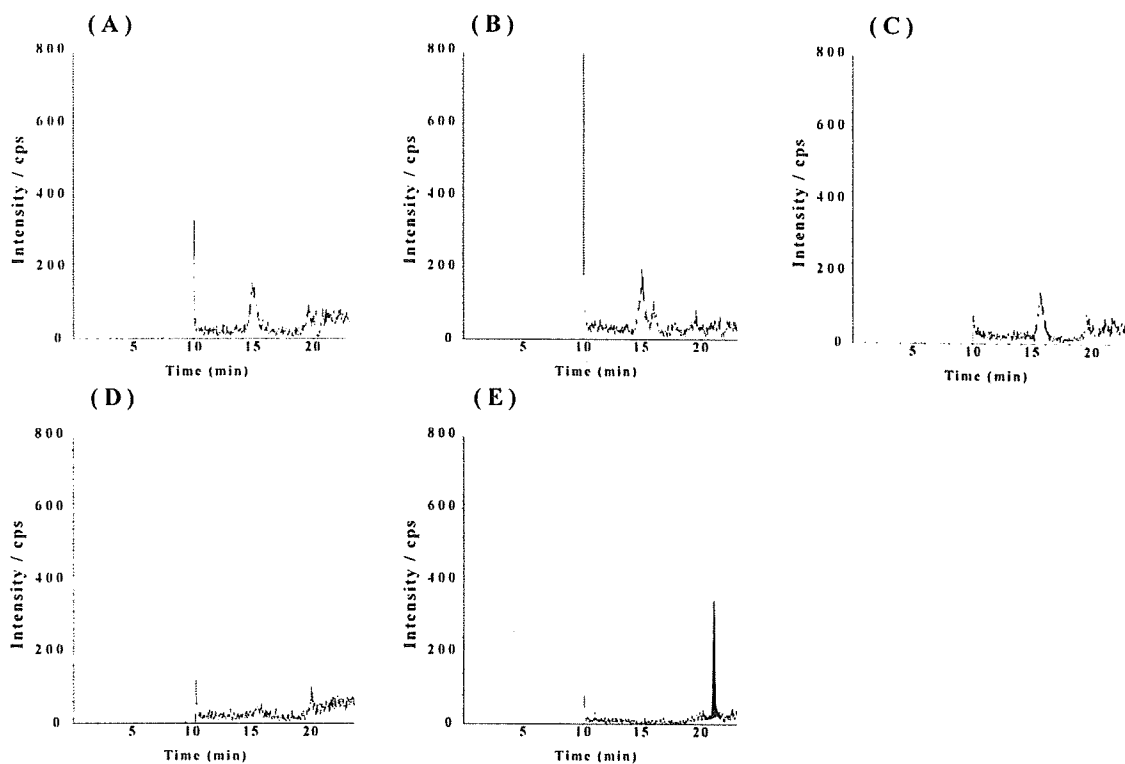


Fig. 4. MRM chromatograms of (A) swine muscle extract, (B) swine liver extract, (C) yellowtail extract, (D) milk extract, (E) standard solution (0.5 ng/mL).

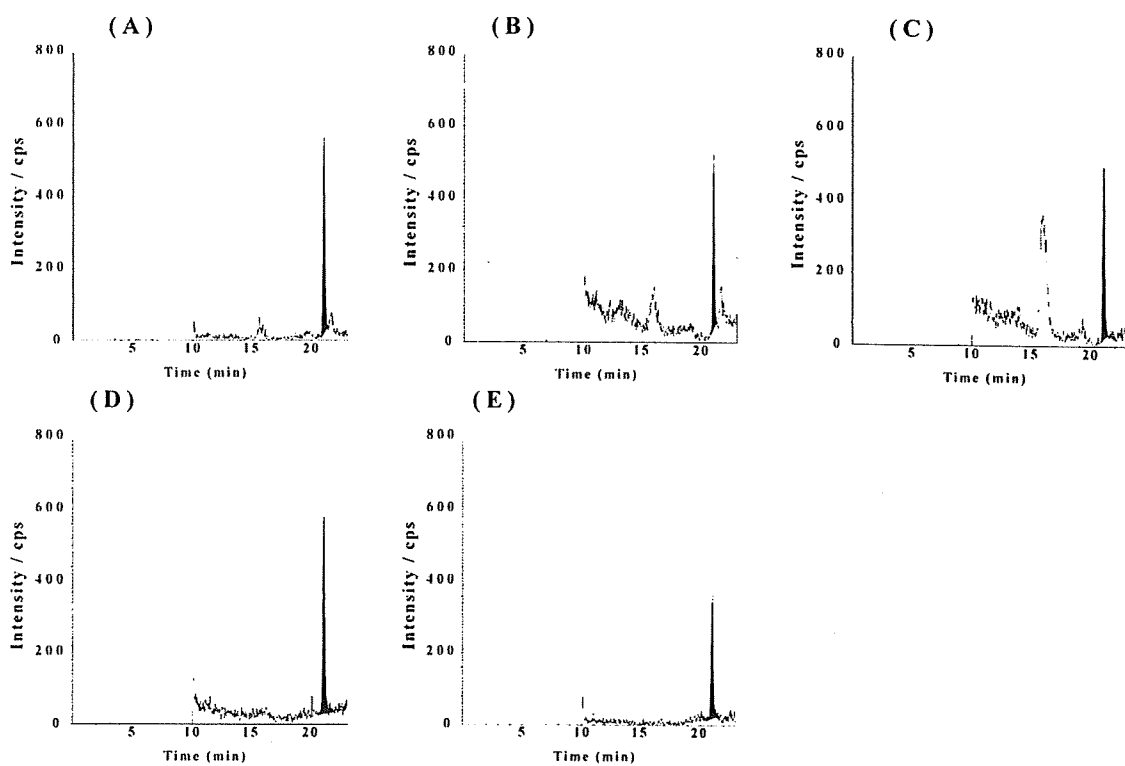


Fig. 5. MRM chromatograms of (A) extract of swine muscle fortified at 0.01 $\mu\text{g/g}$, (B) extract of swine liver fortified at 0.01 $\mu\text{g/g}$, (C) extract of yellowtail fortified at 0.01 $\mu\text{g/g}$, (D) extract of milk fortified at 0.01 $\mu\text{g/g}$, (E) standard solution (0.5 ng/mL).

Table 6. Results of recovery tests of BZM

Sample	Fortified ($\mu\text{g/g}$)	Day 1		Day 2		Interassay	
		Recovery ^a (%)	RSD (%)	Recovery ^a (%)	RSD (%)	Recovery ^b (%)	RSD (%)
Swine muscle	0.2	86.5	7.3	80.2	5.0	83.3	7.8
	0.01	84.0	2.4	98.8	5.4	91.4	12.1
Swine liver	0.2	79.3	2.9	95.7	1.3	87.5	13.4
	0.01	86.2	7.5	71.4	7.4	78.8	14.9
Yellowtail	0.05	80.3	3.7	83.6	4.3	82.0	4.6
	0.01	82.7	2.7	76.4	9.7	79.6	8.3
Milk	0.1	76.1	8.8	84.8	3.8	80.4	9.6
	0.01	88.5	2.5	90.5	5.5	89.5	4.3

^a Mean of 5 replicates.

^b Mean of 2 replicates (average value for each intraday).

討することにより、約 20% のイオン化率の改善はなされたものの、まだ約 10% のイオン化抑制が認められた。そこで、アフラトキシンなどのカビ毒の分析で報告されている多機能カラムの手法³⁾を参考に、先のカートリッジの検討で最も BZM の保持の弱かった Oasis HLB (60 mg) に GL-Pak PLS-2 (500 mg) 処理後の溶解液を通液させることにより、夾雑成分の除去が可能か否か試みた。まず、0.01% ギ酸で希釈した 50 ng/mL の標準溶液 10 mL (500 ng) を Oasis HLB (60 mg) カートリッジに通液して、その通過液を 2 mL ずつ分取して通過液中の BZM 濃度を調べた。その結果、最初の 4 mL では BZM 濃度は、十分ではなかったが、それ以降の溶出フラクションでは 90% 以上の濃度を得ることができた (Table 5)。よって、Oasis HLB (60 mg) カートリッジ通過液の 4 mL 以降の溶液を分取することとした。次に、本精製工程を加えて、豚肝臓を用いてイオン化抑制を確認したところ、ほぼイオン化抑制を解消することができた。

3. 添加回収実験

豚筋肉・肝臓、ブリおよび牛乳について、残留基準値濃度 (豚筋肉・肝臓 0.2 $\mu\text{g/g}$ 、ブリ 0.05 $\mu\text{g/g}$ 、牛乳 0.1 $\mu\text{g/g}$) および 0.01 $\mu\text{g/g}$ 相当濃度になるように標準溶液を 0.5~1 mL 添加して、同日 5 回、異日 2 回の繰り返しで回収実験を実施した。

1.2 LC 条件の検討および 2. 前処理法の検討において、イオン化抑制に対する改善が可能であったため、回収率の算出は絶対検量線法で実施した。

MRM クロマトグラムを Fig. 4 および Fig. 5 に、回収率と相対標準偏差の結果を Table 6 に示した。いずれの試料においても良好なクロマトグラムが得られ、また、いずれの添加濃度においても平均回収率は 70% 以上、併行再現性は 10% 未満、室内再現性は 20% 未満と良好であった。本法による定量下限 ($S/N=10$) は、豚筋肉および牛乳で 0.005 $\mu\text{g/g}$ 、豚肝臓で 0.002 $\mu\text{g/g}$ 、ブリで 0.004 $\mu\text{g/g}$ であった。

また、大阪府で市販されている豚筋肉・肝臓、ブリ (またはハマチ) および牛乳各 3 検体、合計 12 検体について本法を用いて調査した結果、BZM は検出されなかった。

ま と め

LC-MS/MS による畜水産食品中の BZM の分析法を検討した。

1. BZM の LC-MS/MS 条件を最適化した結果、ESI ネガティブイオンモードにおいて、定量用イオンとして、 m/z 301 > 209 が、確認用イオンとして m/z 301 > 184 および 301 > 124 が有効であり、いずれのイオンとも 0.5~25 ng/mL の濃度範囲において良好な直線性を示した。

2. BZM の固相抽出カートリッジとして、濃縮の際は GL-Pak PLS-2 (500 mg) が、イオン化抑制を低減させる際は Oasis HLB (60 mg) が有効であった。

3. 豚筋肉、肝臓、ブリ、乳を用いた添加回収実験の結果、いずれの試料においても平均回収率 70% 以上、併行再現精度 10% 未満、室内再現精度 20% 未満の良好な結果が得られた。

4. 本法における定量限界は、0.002~0.005 $\mu\text{g/g}$ ($S/N=10$) であった。

5. 本法を用いて市販試料 12 検体について調査を行ったところ、いずれの検体からも BZM は検出されなかった。

なお、本研究の一部は日本食品衛生学会第 95 回学術講演会 (2008 年 5 月、東京) において発表した。

文 献

- 1) Saito, K., Horie, M., Hoshino, Y., Nose, N., Nakazawa, H. Determination of bicozamycin in chicken egg and meat by fluorescence densitometry with high performance thin layer chromatography. EISEI KAGAKU, 32, 442-446 (1986).
- 2) Ise, N., Shibutani, H., Oshita, M., Osaki, N., Ueki, M., Fujisaki, M. Determination of bicozamycin and its benzoyl-ester derivative in yellowtail tissues by high performance liquid chromatography. J. Liq. Chromatogr., 16, 2399-2414 (1993).
- 3) Akiyama, H., Chen, D., Miyahara, M., Toyoda, M., Saito, Y. Simple HPLC determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in nuts and corn. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.), 37, 195-201 (1996).

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

学会発表

加工食品試料を用いた 外部精度管理試料調製の検討

○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、尾花裕孝
(大阪府立公衆衛生研究所)

【はじめに】

平成20年初頭に冷凍餃子への農薬混入事件が発覚したため、加工食品に対する農薬分析の需要が喚起された。現時点で加工食品用に通知された分析法は、有機リン系農薬の簡易法のみであり、それ以上の検査要求に対しては、分析機関が各個に対応していると考えられる。当所は厚生労働科学研究費補助金研究の「検査機関の信頼性確保に関する研究」に参画しており、このような加工食品中の農薬分析の現状を検証すべく、外部精度管理試験を行った。

外部精度管理試験は、各機関で用いる試料において、分析対象物質の均質性が保証される必要がある。これまで外部精度管理試験に用いられた試料は、油脂や飲料のような液体か、野菜を粉砕しペースト状にしたものであった。これらは試料自体が均質であり、流動性が高いため、分析対象物質を添加して均一化することが容易であると考えられる。しかし、加工食品が多種類の食材から構成される性質上、添加された農薬濃度の均質性を確保することが難しいと考えられた。そこで、2種類の加工食品を用いて試料調製の検討を行ったので報告する。

【方法】

1、試料調製方法

1-1、レトルトカレー

水を入れた20Lのステンレスバケツを80℃以上に加温し、レトルトカレーのパックを投入して5分間加温した。加温されたカレーはフー

ドプロセッサー(東芝精米機QS-7)に移し、2～3パックを同時に細切した。これを湯煎しながら約60℃に保温したステンレス容器(容量8L:攪拌機(ケンミックス・アイコーKM-800)付属品)へ移し、カレー4kgを集め、攪拌機で5分間攪拌しながら農薬混合液(50μg/mLまたは25μg/mL)を8mL加えた。この操作を2回行い、合計8kg調製して湯煎下で混合し、約200gずつアルミ製シールバッグ(30個)に分包して-20℃で保存した。

1-2、パンケーキ

攪拌機のステンレス容器に市販のホットケーキミックス約2.4kg、M寸卵12個と牛乳1.8Lを入れ、ハンドミキサー(bamix M200)や攪拌機を用いて十分混合した。これに50μg/mL農薬混合液を9.6mL加え、さらに5分間攪拌した。この生地を、杓子一杯(約50g)ずつホットプレート上に移し、表裏各2分間、約160℃で加熱調理した。焼き上がったパンケーキは蒸気がおさまるまでワイヤーラック上で放冷し、その後密封して-20℃で保存した。

2、均質性確認試験

調製した試料の中から、無作為に6個の容器又は6枚のパンケーキを選択し、各検体の均一化を行った。これらから2回ずつ試料を採取し、合計12試料の農薬濃度を測定した。この結果を一元配置分散分析することにより、容器間、又は個体間で農薬濃度の有無を判定し、それによって均質性を評価した。

[結果]

1、レトルトカレー

各農薬の平均濃度は 34 ～ 83ng/g、変動係数は 4 ～ 6% であった。一元配置分散分析を行った結果、カルバリルを除く 14 農薬は分散比が 4.387 (n=12、危険率 5% の場合) 未満であるため、容器間で濃度に差が無く、均質性が確認された。(表 1)

2、パンケーキ

各農薬の平均濃度は 81 ～ 99ng/g、変動係

表 1 一元配置分散分析結果

農薬名	平均 (ng/g)	RSD	分散比
Methamidophos	54	6	0.693
Acephate	61	6	1.326
Dimethoate	71	4	1.480
Tolclofos-methyl	78	4	1.093
Malathion	83	5	1.138
Isofenphos	83	4	1.023
Ethoprophos*	37	5	0.884
Etrimfos*	34	5	1.609
Dimethylvinphos	71	4	1.439
Edifenphos	73	5	4.385
Pyraclofos	79	5	3.349
Fenobucarb	78	5	1.925
Bendiocarb	67	6	2.615
Pirimicarb	75	4	1.021
Carbaryl	65	6	9.694

*：添加濃度 50ng/g

表 2 一元配置分散分析結果

農薬名	平均 (ng/g)	RSD	分散比
Esprocarb	81	9	0.827
Chlorpyrifos	84	10	1.178
Diethofencarb	85	11	2.939
Buprofezin	87	9	0.889
Kresoxim-methyl	87	9	1.172
Tebufenpyrad	88	9	0.636
Fenarimol	85	9	1.242
Bitertanol	86	10	1.408
Imidacloprid	92	13	1.733
Tebufenozide	99	8	0.794

数は 8 ～ 13% であった。一元配置分散分析を行った結果、10 農薬全てが分散比が 4.387 未満であるため、個体間で濃度に差が無く、均質性が確認された。(表 2)

[考察]

はじめに、流動性のある加工食品としてレトルトカレーを選択した。このレトルトカレーに農薬を添加して予備試験を行ったところ、保存中に油脂分が分離し、農薬が偏在化する問題点が発覚した。そこで農薬を均一に分布させるため、試料の調製および採取において、加温し油脂を融解後再均質化することで改善できた。しかし、試料中に油脂や香辛料など夾雑物が多く、農薬の測定が困難な試料であり、農薬の回収率が低い傾向であった。

次に、凍結融解で試料の状態が変化しにくい加工食品として、パンケーキを選択した。これは生地段階では流動性があり、調理後は固体化するため、凍結融解後でも再均質化する必要がないと考えられた。しかし、パンケーキへの添加は生地の状態で行うため、加熱調理による農薬への影響が懸念された。そこで農薬を添加した生地を用い、調理時間と農薬回収率の推移を調査した。その結果、通常の調理時間においては、水分の蒸発と共に農薬が消失している可能性が示唆されたが、それ以上の大幅な農薬の消失は見られなかった。この結果と均質性試験の結果から、パンケーキ試料は外部精度管理試料として使用可能であると結論づけた。

[謝辞]

本研究は平成 20 ～ 21 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。外部精度管理試験に参加していただいた岩手県、新潟県、愛知県、奈良県、神戸市、広島市、徳島県及び北九州市の 8 地方衛生研究所の皆様へ感謝します。

農産物を主原料とした加工食品の残留農薬実態調査

○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、尾花裕孝(大阪府立公衆衛生研究所)

【1 諸言】

中国産冷凍餃子の喫食による健康被害の発生事案を契機に、国民の食の安全に対する意識がますます高まるなか、生鮮食品のみならず、加工食品中の残留農薬の検査も急務となっている。また、加工食品については、調理過程が複雑なもの、多種類の原料が複合しているものなど多岐におよぶため、画一的な検査手法を用いることが困難と考えられ、調理過程や食品成分の特性に着目した個別の分析法の構築が必要である。我々は、以前、分析上の支障となる食品中の脂質の特性に着目し、脂質含有量の多い加工食品を対象とした分析法を構築し、市場流通品の実態調査を行ってきたところである(1)。このたび、我々は、脂質含有量は低いが、糖分、塩分あるいは香辛料を多く含むような、農産物を主原料とした加工食品や蜂蜜、シロップ類(加工食品等)について、QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safety) 法に準拠した方法を検討し、当該検査手法を用いた市場流通品の実態調査を行ったので報告する。

【2 実験方法】

[2-1 評価対象農薬]

評価対象とした農薬は、高取らの方法(2)に準拠した、GC/MSで測定が困難な農薬を含み、LC/MS/MSで感度が高く得られる農薬を中心に 99 項目を選定した。これら農薬の混合標準液を調製し、メタノールで適宜希釈して添加回収試験および検量線の作成に用いた。

[2-2 試料]

添加回収試験に供した食品は、食品成分の特性に応じて、表 1 に示すとおり、大きく 6 つのカテゴリに分類したうえで、これらカテゴリの代表食品として選定した 6 種類の食品について、20 及び 100 ng/g の両方の濃度で実施した (n=5)。また、市場流通品については、この分類した 6 つのカテゴリをあわせ、合計 50 サンプルについて測定を実施中である。

[2-3 LC/MS/MS]

LC: 1100Series (Agilent)、MS/MS: API3000 (Applied Biosystems)

LC カラム: SUPELCO 社製 ASCENTIS C18, 2.1 × 100mm, 3 μm、カラム温度: 40°C、

移動相 A: 0.1%ギ酸水溶液、移動相 B: 0.1%ギ酸含有メタノール溶液、

グラジエント条件: B25→95% (12min, リニア)→95% (8min, 保持)、流速: 200 μL/min、

注入量: 5 μL、イオン化法: ESI (+)、分析モード: MRM、イオンスプレー電圧: 4.0kV、

イオン源温度: 450°C

[2-4 試料前処理]

フードプロセッサで均一化(漬物の漬け汁や糠等、食品の容器包装内の内容物全量(梅干しの種は除く。))

を処理。)した試料 5 g をポリプロピレン製チューブ (50 mL) に採取し、MilliQ 水 5 mL を添加後、30 分間静置した。これにアセトニトリル 20 mL を添加し、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いた塩化ナトリウム 1 g および無水硫酸マグネシウム 4 g を添加し、直ちに 1 分間振とう攪拌後、遠心分離を行った。次に、遠心後の上澄みのアセトニトリル層を、アセトニトリル/トルエン混液 (3/1) 30 mL でコンデショニングした ENVI-Carb II/PSA ミニカラムに 16 mL (食品 4 g 相当) 負荷し、アセトニトリル/トルエン混液 (3/1) 30 mL で溶出した。この負荷液及び溶出液を 100 mL ナス型フラスコに補集し、40°C 以下で減圧濃縮した。この濃縮液を窒素気流下で乾固後、メタノールで 2.0 mL に定容し、これを MilliQ 水で 4 倍希釈して試験液 (0.5 g/mL) とした。

表 1 分類した食品のカテゴリおよび添加回収試験供試品並びに市場流通品の具体例

分類	加工食品等 (蜂蜜とシロップ類を含む。)の特性	添加回収試験供試品	実態調査の食品例	サンプル数
1	高度に糖分を含む農産物加工品類	オレンジマーレード	ジャム、ゆであずき等	10
2	乾燥果実類	レーズン	プルーン、ドライマンゴー等	8
3	漬け物類	キムチ	塩漬け、醤油漬け、酢漬け等	15
4	高度に酸を含む農産物加工品類	梅干し	梅干し、梅肉等	4
5	調味料類	ソース	ソース、ケチャップ等	10
6	蜂蜜及びシロップ類	蜂蜜	蜂蜜、メープルシロップ	3
		合計		50

【3 結果及び考察】

食品中の残留農薬一斉分析法に係る試験成績の評価は、回収率 70~120% 及び相対標準偏差(RSD)が 20%未滿になることが許容される成績と解釈されており、本結果で同様の評価を行った場合、6 種類の食品すべてにおいて、20 及び 100 ng/g の両方の添加濃度で許容される試験成績となったのは 64 項目であった。

現在、市場流通品については、実態調査を行っているところである。これら実態調査で検出された値を、直接、食品衛生法の農薬残留基準値と比較する場合、基準値超過の判断を行うことが困難となることも予測される。例えば、当該加工食品を構成する農産物が比較的単純であるような単一の農産物のみで構成される漬物であれば、食品中に含有する当該農産物のみの含有割合を考慮すればよいが、特に、複合成分が多い加工食品で残留農薬が高く検出された場合については、検出値の取り扱いが困難であることが推測される。ポジティブリスト制度施行により、農薬の残留基準値を加工食品に適用するにあたっては、今後、加工食品中の複合成分の組成割合等を考慮する手法を検討していく必要があると考えられる。

- 1) 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、尾花裕孝、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* 50, 10~15 (2009)
- 2) Takatori,S., Okihashi,M., Okamoto,Y., Kitagawa,Y., Kakimoto,S., Murata,H., Sumimoto,T., Tanaka,Y. A rapid and easy multiresidue method for the determination of pesticide residues in vegetables,fruits,and cereals using liquid chromatography/tandem mass spectrometry., *JAOAC Int*, 91, 871~883 (2008)

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

○ 畠山 えり子 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)

1. はじめに

昨年、加工食品への農薬混入による健康被害事例が相次いで発生したことを背景に、加工食品中の農薬を迅速に分析することが可能な分析法の開発が急務となっている。一方、平成 18 年 5 月、食品中の残留農薬基準にポジティブリスト制が施行されたことに伴い、基準項目が大幅に拡大したことから、効率的な分析法として、多成分一斉分析法の開発が進められてきている。しかし、中には、一斉分析法による方法では測定が困難なため、個別に分析する必要がある農薬もあり、事件・事故等における迅速な対応が求められている。

そこで、本研究では、一斉分析法では測定が困難な代表的な農薬の一つで、かつ中毒事例が多く報告されているグルホシネートおよびその代謝物 3-メチルホスフィニコプロピオン酸 (MPPA) を対象に、LC/MS/MS を用い、簡易迅速に測定する方法について検討したので報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

牛乳、緑茶飲料、野菜ジュース、オレンジジュース、乳飲料 (ココアラテ)、冷凍ギョウザ及びカレールーを用いた。

2.2 試薬等

標準品および試薬は残留農薬試験用あるいは LC/MS 用を用いた。

固相: バリアン社製 Bond Elut C18(500mg)、Waters 社製 Oasis HLB(200mg)、Alltec 社製 SAX(500mg)、バリアン社製 Bond Elut SAX(500mg)、限外ろ過膜: Millipore 社製 Microcon YM30を用いた。

2.3 装置および測定条件

高速液体クロマトグラフ: Agilent 社製 1100シリーズ

カラム: SeQuant 社製 ZIC-*p*HILIC (2.1×150mm、粒子径5μm)

カラム温度: 40°C

移動相: A液 0.1%ギ酸、B液 0.1%ギ酸含有アセトニトリル

グラジエント条件: 0~5分 (70:30→40:60)、5~11分 (40:60)、11.01~15分 (70:30)

流速: 0.2mL/min、注入量: 5μL

質量分析装置: Applied Biosystems 社製 API4000

イオン化法: ESI Negative、測定モード: MRM

イオンスプレー電圧: -3.5kV、イオンソース温度: 600°C

MRM条件：グルホシネート；定量用179.1/63.1、確認用179.9/95.2、
MPPA；定量用150.8/63.1、確認用150.8/106.8

2.4 試験溶液の調製

2.4.1 試験法 I

磨砕均質化した試料 5g を 50mL ポリプロピレン遠沈管に採取し、50%メタノール溶液 20mL を加え、10 分間振とう抽出した。その後、3,000rpm で 10 分間遠心分離し、上清を分取して 50%メタノールで 25mL に定容した。抽出液 1mL を C18 (500mg) と SAX(500mg)を上下に連結(あらかじめメタノール 5mL 及び 50%メタノール 5mL でコンディショニング)したカラムに負荷した。さらに、50%メタノール 3mL で溶出させたのち、C18 カラムをはずし、SAX カラムを 50%メタノール 5mL で洗浄したのち、60%酢酸 12mL でグルホシネートおよび MPPA を溶出させた。溶出液は 50°C以下で減圧濃縮、窒素気流下で乾固させたのち、50%メタノールで 2mL に定容したものを試験溶液とした。

2.4.2 試験法 II

磨砕均質化した試料 1g を 10mL ポリプロピレン遠沈管に採取し、50%メタノール溶液 9mL を加え、10 分間振とう抽出した。その後、3,000rpm で 10 分間遠心分離し、上清を分取して 50%メタノールで 10mL に定容した。さらに、50%メタノールを用いて 1000 倍に希釈した溶液を Microcon YM30 を用いて遠心ろ過し、試験溶液とした。

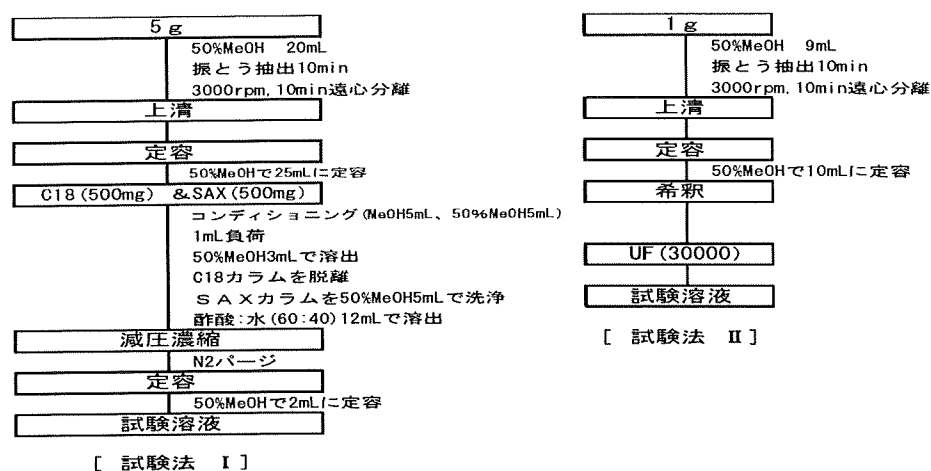


図 1 試験溶液の調製方法

3. 結果及び考察

3.1 LC 条件

グルホシネートは非常に解離性が高く、ODS系のカラムに保持させることは困難である。今回、高極性物質の分析に適しているとされるHILICカラム2種類 (ZIC-*p*HILIC、TSK-gel Amide-80) とマルチモード系ポリマーゲルカラム (TSK-gel VMpak25) について比較検討した結果、ZIC-*p*HILICカラムにおいて感度及びピーク形状とも良好なクロマトグラムが得られた。(図2)

移動相について、添加する揮発性の添加剤 (ギ酸、酢酸アンモニウムおよびギ酸+酢酸

の溶解を抑えるため、水：メタノール（1:1）混液を用いることにした。

3.4.2 ミニカラムによる精製法の検討

グルホシネートの作物残留分析法は、水で抽出し、イオン交換樹脂カラム精製、オルト酢酸トリメチルによる誘導体化 GC/FPD 分析となっている。本試験法は、煩雑な精製操作が必要なため、検査の迅速化が困難な状況にある。本研究では、検出器として高選択性・高感度分析が期待できる LC/MS/MS を用いた。LC/MS/MS で分析を行う場合、試料由来のマトリックスがイオン化を抑制または促進し、検出感度に影響を与えることが知られている。そこで、逆相系のミニカラムおよびイオン交換系のミニカラムを用いた精製法について検討した。逆相系のミニカラムは C18(500mg)ミニカラムおよび Oasis HLB(200mg)ミニカラム、イオン交換系のミニカラムは陰イオン交換系の SAX(500mg)ミニカラムを用いた。なお、SAX ミニカラムは、オルテック社製とバリアン社製のものを比較した。

50%メタノールで調製した標準品溶液（10ng/mL）の C18 ミニカラムおよび HLB ミニカラムでの回収試験の結果を図 3 に示した。50%メタノール 5mL で両成分ともほぼ回収できることがわかった。次に、食品の抽出液を用い、色素等の溶出を確認した。その結果、牛乳では、HLB ミニカラムでの溶出液に白濁が認められたが、食品由来の色素は両ミニカラムに保持され、溶出しないことが確認された。SAX ミニカラムの比較では、グルホシネートおよび MPPA は 50%メタノール負荷の条件で、両ミニカラムに保持され、50%メタノールにより洗浄することが可能であった。すなわち、カラムの洗浄操作を加えることで、極性マトリックスの除去効果が高まることが推定された。SAX ミニカラムからの溶出試験の結果を図 4 に示した。MPPA において両カラムでの回収率に差が認められ、両成分で回収率が良好であった Alltech 社製の SAX を採用した。これらの回収試験の結果をもとに、それぞれ特性の違うミニカラムを連結して用いることにより、精製効果を高めつつ、操作の簡略化を図った。

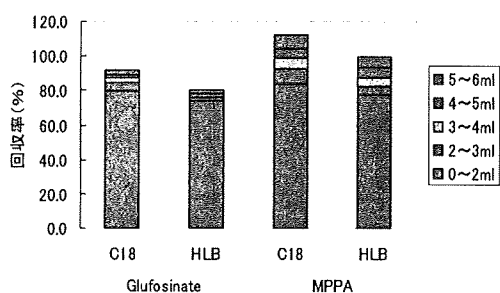


図 3 C18 および Oasis HLB ミニカラムにおけるフラクション別回収率

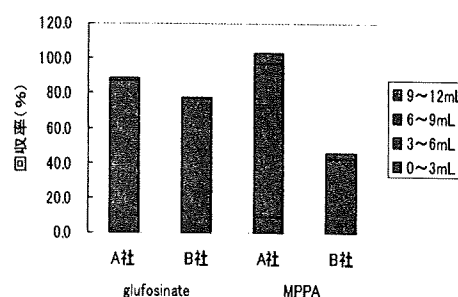


図 4 SAX ミニカラムにおけるフラクション別回収率
A: Alltech 社, B: Varian 社

3.4.3 添加回収試験

試験法 I を用い、牛乳、茶飲料、野菜ジュース、冷凍ギョウザ、カレールーを対象に、グルホシネートおよび MPPA をそれぞれ 0.01 μ g/g 相当添加した場合の回収試験の結果を表 2 に示した。グルホシネートでは、対象とした 5 食品で変動係数 3.2~15.2%、回収率

72.4~99.3%と良好な結果が得られた。MPPA では、カレールーを除く 4 食品において変動係数 6.1~12.7%、回収率 73.7~120.7%と良好な結果が得られた。カレールーにおいては変動係数、回収率とも悪い結果であった。

表 2 加工食品の添加回収試験結果

農薬名	野菜ジュース		牛乳		緑茶飲料		冷凍ギョウザ		カレールー	
	回収率	Cv.	回収率	Cv.	回収率	Cv.	回収率	Cv.	回収率	Cv.
Glufosinate	99.3	5.5	87.3	5.6	92.1	3.2	91.1	7.4	72.4	15.2
MPPA	73.7	6.6	99.4	12.7	98.1	6.1	120.7	8.1	171.8	83.3

添加濃度：0.01ppm、併行試験数：n=3

次に、本試験法による、マトリックスの影響を判断するため、マトリックス STD. と溶媒 STD. のピーク面積の比較した結果を表 3 に示した。グルホシネートにおいては 0.89 から 1.04 とほとんどマトリックスの影響を受けていない結果であったが、MPPA においては 0.45 から 3.11 とマトリックスの影響が大きい結果であった。MPPA は、LC カラムでの保持が弱く、溶出時間が早いため、マトリックスの影響を受けやすいことが示唆された。

表 3 マトリックスSTDと溶媒STDの面積比

品名	Glufosinate	MPPA
野菜ジュース	0.98	0.45
牛乳	1.04	3.11
緑茶	1.00	1.29
冷凍ギョウザ	0.89	0.70
カレールー	0.92	0.67

試験法Ⅱを用い、グルホシネートが食品に混入されたことによる健康被害事故対応を想定し、添加濃度を 10ppm に設定して、市販の牛乳、ココアラテ、緑茶飲料、オレンジジュースおよび野菜・果実ジュースを対象に添加回収試験を実施した。1000 倍に希釈して測定した回収率は、緑茶飲料で 50.7%と若干低い結果であったが、他の食品は 70~120%に入る良好な結果であった。各食品の添加回収試験において得られたグルホシネートの定量用 MRM クロマトグラムを図 3 に示した。マトリックスの妨害のない良好なクロマトグラムが得られた。また、確認用の MRM クロマトグラムも同様な結果が得られた。

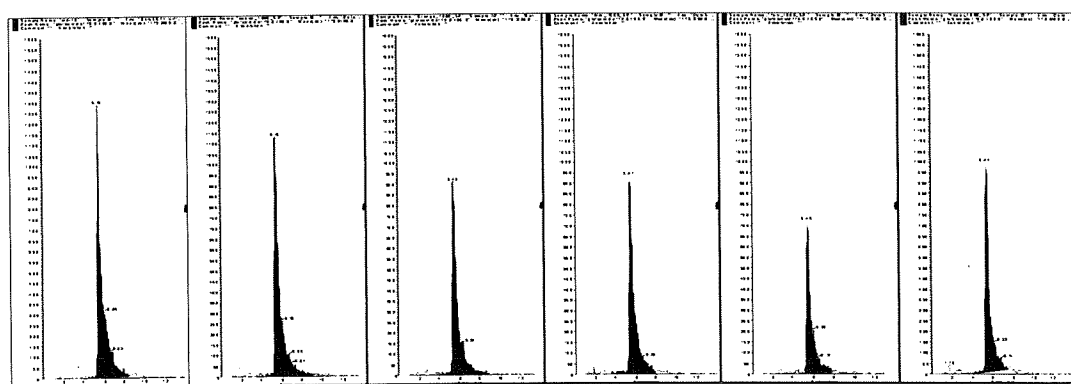


図 3 グルホシネートの 2MRM クロマトグラム、左から std.(10ng/g) ココアラテ、牛乳、オレンジジュース、緑茶飲料、野菜・果実ジュース

4 まとめ

加工食品中のグルホシネートおよび代謝物の残留分析法を検討し、50%メタノール抽出、C18 ミニカラム及びSAX ミニカラムにより精製し、LC/MS/MS で定量及び確認する方法を確立した。（試験法Ⅰ）

また、健康被害事例を想定し、1000 倍に希釈した試験溶液を限外ろ過膜により遠心ろ過したのち、直接、LC/MS/MS で測定する迅速分析法も確立した。（試験法Ⅱ）

試験法Ⅰを野菜ジュース、牛乳、緑茶飲料、冷凍ギョウザ及びカレーの 5 品目に適用した場合、0.01ppm 添加の平均回収率はグルホシネートで 72.4～99.3%、MPPA でカレーを除く 4 品目で 73.7～120.7%と、低濃度レベルにおいても良好な結果が得られた。

試験法Ⅱを牛乳、ココアラテ、緑茶飲料、オレンジジュース及び野菜・果実ジュースに適用した場合、希釈、限外ろ過するだけの簡単な前処理で直接 LC/MS/MS を用いて測定した結果、茶飲料で回収率が 50.7%と若干低い結果であったが、その他の食品は 70～120%に入る良好な結果であった。

これらの結果から、試験法Ⅰは加工食品中のグルホシネート及びその代謝物の試験法として、試験法Ⅱはグルホシネートを原因物質とする健康被害発生時の試験法として適用可能であると考えられた。

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

○ 畠山えり子¹⁾、阿久津千寿子¹⁾、青木晴美¹⁾、梶田弘子²⁾
(¹⁾ 岩手県環境保健研究センター、²⁾ 岩手県食肉衛生検査所)

1. はじめに

加工食品への農薬混入による健康被害事例が相次いで発生したことを背景に、加工食品中の農薬分析の需要が高まっている。本研究では、一斉分析では測定が困難な代表的な農薬の一つで、かつ食中毒事例の多い含リンアミノ酸系除草剤グルホシネートおよびグリホサートの迅速分析法について検討した。グルホシネートおよびグリホサートは両性イオンの極めて高極性の性質を有するため、誘導体化したのち分析することが一般的であり、そのため煩雑な操作を必要としており、迅速性に欠けることが指摘されている。今回は、誘導体化の操作をせずに LC/MS/MS で直接測定する方法について検討したので報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

市販の牛乳、緑茶飲料、オレンジジュースを用いた。

2.2 試薬等

標準品および試薬は残留農薬試験用あるいは LC/MS 用を用いた。

固相：バリアン社製 Bond Elut C18 (1000mg)、Waters 社製 Oasis HLB (200mg)、限外ろ過膜：Millipore 社製 Microcon YM30 を用いた。

2.3 装置および測定条件

高速液体クロマトグラフ：Agilent 社製 1100、カラム：SeQuant 社製 ZIC-pHILIC (2.1×150mm、粒子径 5μm)、カラム温度：40℃、移動相：A液 0.1%ギ酸、B液 0.1%ギ酸含有アセトニトリル、グラジエント条件：0~5分 (70 : 30→40 : 60)、5~11分 (40 : 60)、11.01~15分 (70 : 30)、流速：0.2mL/min、注入量：5μL

質量分析装置：Applied Biosystems 社製 API4000、イオン化法：ESI (-)、測定モード：MRM
イオンスプレー電圧：-4.5kV、イオンソース温度：600度

2.4 試験溶液の調製

2.4.1 試験法 I

均質化した試料 1g を 15mL ポリプロピレン遠沈管に採取し、50%メタノール溶液 9mL を加え、10 分間振とう抽出した。その後、3,000rpm で 10 分間遠心分離し、上清を分取して 50%メタノールで 10mL に定容した。その抽出液 1mL を、あらかじめメタノール 5mL 及び 50%メタノール 5mL でコンデショニングした C18 (1000mg) カラムに負荷し、50%メタノール 1mL で溶出、2mL に定容したものを試験溶液とした。

2.4.2 試験法 II

試験法 I により調製した抽出液をさらに 50%メタノールで 5 倍に希釈し、Microcon YM30 を用いて遠心ろ過したものを試験溶液とした。

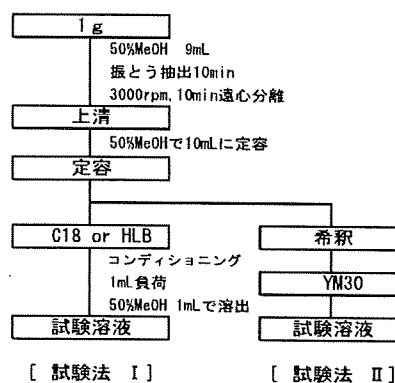


図1 試験溶液の調製方法

3. 結果及び考察

3.1 LC 条件

グルホシネートおよびグリホサートは非常に解離性が高く、ODS系のカラムに保持させることは困難である。そこで、高極性物質の保持に優れるHILIC系カラム (SeQuant 社製 ZIC-pHILIC) を用い、LC条件を検討した。その結果、移動相に用いる揮発性の添加剤はギ酸を用いることによりカラムへの保持および感度が向上する

こと、各成分のイオン化に与える移動相の溶媒比率は、グルホシネートおよびAMPAは60%で、グリホサートは30%の条件で感度が向上することが確認できたため、前述のグラジエント条件を作成した。

3.2 MS 条件

インターフェースには極性化合物のイオン化に適した ESI を選択した。各標準溶液(0.1 μ g/mL)をインフュージョン法により直接 MS 部に導入しイオン化条件を検討した結果、表 1 に示す条件が最適であった。

表-1 MS条件

分析成分		Q1	Q3	DP	GE	CXP
グルホシネート	定量用	179.9	63.1	-60	-54	-3
	確認用	179.9	95.2	-60	-24	-5
グリホサート	定量用	167.8	63.1	-50	-36	-3
	確認用	167.8	80.8	-50	-28	-5
AMPA	定量用	109.9	63.1	-60	-28	-3
	確認用	109.9	78.9	-60	-30	-5

3.3 検量線および検出下限

50%メタノールを用いて調製した混合標準溶液0.0005から0.100 μ g/mLのピーク面積から検量線を作成した。グリホサートは0.002から、その他は0.0005から0.100 μ g/mLの範囲で直線性を示し、相関係数は共に $r = 0.999$ であった。

3.4 前処理法の検討

3.4.1 抽出溶媒

両物質は水への溶解性が高いため、抽出には、通常、水が用いられる。しかし、本法では、試料中の糖類や水溶性の夾雑物成分の溶解を抑えるため、水：メタノール（1:1）混液を用いることにした。

3.4.2 ミニカラムによる精製法の検討

LC/MS/MS で分析を行う場合、試料由来のマトリックスがイオン化を抑制または促進し、検出感度に影響を与えることが知られている。今回は、対象物質が高極性であることに着目し、逆相系のミニカラムを用いる精製法を試みた。50%メタノール調製した標準品溶液（50ng/mL）1mL を C18 カラムおよび HLB カラムに負荷したのち 50%メタノールで溶出し、対象成分の溶出画分を確認した結果を図 2 に示した。その結果、いずれも、0~2mL の画分に 50%以上溶出していることが確認できたことから、迅速性を優先し、溶出量を 2mL とした。

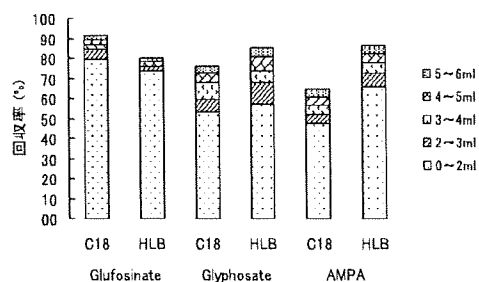


図 2 C18 および Oasis HLB ミニカラムにおけるフラクション別回収率

3.4.3 添加回収試験

試験法 I および II を用い、牛乳、茶飲料、オレンジジュースを対象に、グルホシネート、グリホサートおよび AMPA をそれぞれ 0.05 μ g/g 相当添加した場合の回収試験の結果を表 2 に示した。オレンジジュースでグリホサートの回収率がマトリックスの影響により高めであったが、それ以外はほぼ良好な結果であった。なお、牛乳では HLB 精製の場合、白濁が認められたことから、限外ろ過膜による処理を追加した。概ね、どの成分も、標準品のみのフラクション回収試験の結果に比べて、早く溶出する傾向が認められた。このことは、マトリックスが存在する場合、カラムへの吸着が弱くなっていることが示唆された。

表-2 添加回収試験 (n=3、添加濃度0.5 μ g/g)

農薬名	牛乳 ¹⁾		緑茶飲料 ¹⁾				オレンジジュース ¹⁾				牛乳 ²⁾			
	C18		HLB+UF		C18		HLB		C18		HLB		UF	
	Rec.	C.V.	Rec.	C.V.	Rec.	C.V.	Rec.	C.V.	Rec.	C.V.	Rec.	C.V.	Rec.	C.V.
グルホシネート	81.2	17.4	85.3	6.7	94.3	13.0	89.6	7.6	92.4	8.8	96.9	2.1	77.2	7.8
グリホサート	116.1	9.0	120.8	22.4	105.6	6.7	100.3	20.8	224.5	4.4	150.7	4.9	85.4	12.5
AMPA	62.4	11.3	65.2	13.3	106.8	9.2	66.9	33.5	112.9	6.4	91.2	4.2	82.6	1.1

¹⁾ : 20倍希釈 ²⁾ : 50倍希釈

4 まとめ

LC/MS/MS を用い、加工食品中のグルホシネート、グリホサートおよび代謝物 AMPA の迅速分析法を検討した。今回、LC 用カラムに HILIC 系カラムを用いることにより、グルホシネート、グリホサートおよび代謝物 AMPA の同時分析が可能な条件を確立した。本法による定量下限値は、グルホシネートおよび AMPA で 0.02 μ g/g、グリホサートで 0.1 μ g/g であり、LC(UV)法やキャピラリー電気泳動法に比べて極めて高感度分析が可能であった。また、確立した前処理法は濃縮操作を省略したことにより、測定時間を含めても 2 時間程度で定性と定量が可能であり、食品への混入事件などにおける迅速分析法として、有用な手法と考えられる。

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

○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）

【緒言】

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。

当所では、畜水産物を対象とする試験において、①DDT、クロルデンなどの環境汚染物質に加えて、農薬の使用状況、安定性および脂肪組織への蓄積性（log Pow が 2~3 以上）を考慮した上で、およそ 200 種類の対象成分を選択している。また、②脂肪組織中に濃縮/残留している農薬成分を効率良く分配/抽出可能なアセトン/ヘキサン抽出法を採用し、遠心により分離したヘキサン層のみを粗抽出液としている。そして、③脂質成分を効率良く除去可能なGPC（gel permeation chromatography）、およびPSA（primary secondary amine）を基本とするSPE（solid-phase extraction）により脱脂/精製を行って検液としている¹⁾。

①~③は「畜水産物中に濃縮/残留する農薬成分の実態把握等」²⁾においては有効な方法であると考えられる。しかし、ポジティブリスト制度下において、中国製冷凍ギョーザ中メタミドホスのような事例に対応する方法としては問題点も見受けられた。例えば、メタミドホスのような水溶性が高い農薬成分は、①脂肪組織への蓄積性が低いことから対象外としており、②遠心により分離したヘキサン層にほとんど分配/抽出されない。また、③必ずしも普及しているとは言えないGPC代替の脱脂/精製法も必要である。

今回、「厚生労働省医薬食品局食品安全部残留農薬等に関するポジティブリスト制度導入に係る分析法開発事業」により畜水産物中のメタミドホスなど水溶性の高い農薬成分を含む一斉分析法、およびクマホス分析法を検討したところ、脱水/抽出および脱脂/精製操作において多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーが有効と考えられたので報告する。

【実験方法】

試料：牛肉、さけ、えび、あさり、鶏卵、牛乳、はちみつの7種類を用いた。それぞれ200gを量り採り、10%L-アスコルビン酸水溶液36g、次いで10%ブチルヒドロキシトルエンヘキサン溶液4gを添加後、細切均一化した³⁾。

試料溶液の調製：以下に示すカラムおよび装置などを用い、図1および図2に準じて調製した。多孔性ケイソウ土カラム； ジーエルサイエンス製InertSep K-solute (20 mL保持用)、SAX/PSAミニカラム； ジーエルサイエンス製InertSep SAX/PSA (500 mg/500 mg/6 mL)、濃縮/SPE装置； Büchi社製多検体エバポレーター-Syncore Analyst (12検体用、SPEアドバンスタイプモジュール付き)、GPC装置； 昭和電工製CLNpak EV-2000 (20 mm i.d. × 300 mm) およびCLNpak EV-G

(20 mm i.d. × 100 mm) を装着した島津製作所製GPCクリーンアップシステムまたはジーエルサイエンス製G-Prep GPC8100システム。

LC-MS測定： 島津製作所製 LCMS-2010A を用い、以下の条件に設定した。カラム；資生堂製 Capcell Pak C18 AQ (2 mm i.d. × 150 mm, 3 μm), カラム温度； 40°C, 移動相； A 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液, B 5 mmol/L 酢酸アンモニウムメタノール, B% 0% (0 min) → 95% (10 min) → 95% (20 min) → 0% (20.01 min) → Stop, 流速； 0.2 mL/min, イオン化モード； ESI(+), 測定モード； SIM, 注入量； 5 μL。

GC-FPD測定： 島津製作所製GC-2010を用い、以下の条件に設定した。カラム； Restek社製Rtx-200MS (0.32 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm), カラム温度； 60°C(1 min) → 25°C/min → 210°C → 10°C/min → 280°C(10 min), 注入口温度； 250°C, 検出器温度； 280°C, キャリヤガス線速度； 40 cm/秒, 注入方式； スプリットレス (1 min, 200 kPa), 注入量； 1 μL。

細切試料 12 g

0.1 mol/L 塩酸 10 mL (液体試料は 5 mL) 加えてホモジナイズ

アセトン/ヘキサン抽出

アセトン/ヘキサン (2:3) 60 mL でホモジナイズ抽出

遠心分離後, 有機層及び水層を吸引ろ過

(残渣をアセトン/ヘキサン (2:3) 30 mL で再度ホモジナイズ抽出)

約 15 mL まで濃縮

多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーによる脱水/抽出

塩化ナトリウム 7 g を加えて飽和/溶解後, 負荷

15 分間放置後, 酢酸エチル 100 mL で洗い込み, 負荷

抽出液を濃縮

GPC

アセトン/シクロヘキサン (1:4) で 10 mL に定容

遠心分離後, 上清 4 mL を注入

アセトン/シクロヘキサン (1:4) 5 mL/min で溶出

60~125 mL の画分を分取し, 濃縮

SAX/PSAミニカラムSPE

アセトン 5 mL で洗い込み, 負荷

アセトン 20 mL で溶出

濃縮後, メタノールで 4 mL に定容

LC-MS

図1 メタミドホスなどの一斉分析フロー

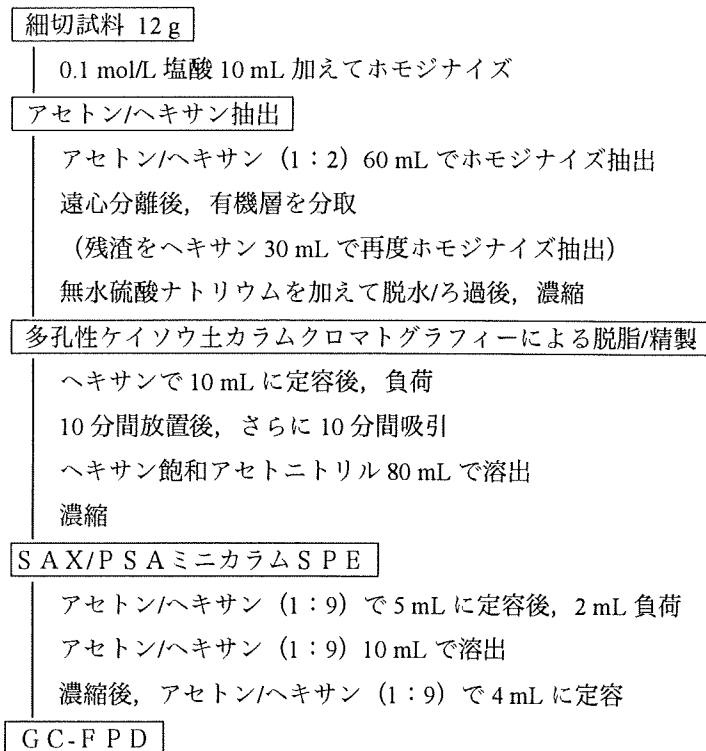


図2 クマホスの分析フロー

【結果および考察】

多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーによる脱水/抽出：メタミドホスのような比較的極性の高い農薬成分を試料から無水硫酸ナトリウムで脱水しながら酢酸エチルで抽出する方法がよく知られている⁴⁾。しかし、試料によっては糖分 ($\log Pow = -5 \sim -2$) やアミノ酸 ($\log Pow = -5 \sim -1$ 、pH に依存) などの妨害成分も大量に抽出される。また、これらの成分によって無水硫酸ナトリウムの粘性が高まり、抽出が困難となる場合もある。

今回、メタミドホスなど 10 種類の農薬成分 ($\log Pow = -1 \sim 4$) (表 1) を対象にして検討した結果、脂肪組織を溶解しながら、効率良く分配/抽出可能な従来のアセトン/ヘキサン抽出法を踏襲することにした。そして、図 1 に示したように遠心により分離した有機層と共に水層も分取して濃縮後、多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーにより脱水/抽出する方法を採用した。カラムには、比較的大きく均一な粒子が充てんしてあり、目詰まりの起こりにくい InertSep K-solute (20 mL 保持用) を使い、塩化ナトリウムで飽和させた粗抽出液をカラムに負荷して 15 分間放置後、酢酸エチルで抽出したところ、各成分は 100 mL までの面分に 90% 以上溶出した (表 1)。なお、SPE モジュール付き Syncore Analyst を使用することで、脱水/抽出などの操作を迅速に行うことができた。

表1 農薬成分のlog Pow, 水溶解性, および多孔性ケイソウ土カラムからの溶出率

成分名	log Pow (20°C)	水溶解性 mg/L (20°C)	多孔性ケイソウ土カラム からの溶出率 %		
			酢酸エチル (脱水/抽出)		
			0~50 mL	~100 mL	~150 mL
アセフェート	-0.89	790,000	71	20	5
メタミドホス	-0.8	>200,000	78	14	2
オメトエート	-0.74	-	81	16	1
ジクロルボス	1.42	18,000	94	0	0
デメトン-S-メチル	1.32	22,000	96	0	0
オキシデメトンメチル	-0.74	-	73	24	7
デメトン-S-メチルスルホン	-	-	91	6	4
ホレート	3.92	50	95	0	0
ホレートスルホキシド	-	-	78	16	3
ホレートスルホン	-	-	92	4	1

多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーによる脱脂/精製: GPC代替の脱脂/精製法として、食肉などから大量に抽出されてくるトリグリセライド (log Pow >20) など脂質成分の大部分を除去可能なヘキサン/アセトニトリル分配法の採用が適切と考えられた。しかし、操作が煩雑な上に、試料によっては強固なエマルジョンが形成される場合があった。そのため、図2に示したようにヘキサン/アセトニトリル分配を多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーにより行う方法とした。カラムには、上述の InertSep K-solute (20 mL 保持用)を用い、ヘキサンに溶解した粗抽出液 10 mL をカラムに負荷して 10 分間放置し、さらに 10 分間吸引して大部分のヘキサンを留去後、ヘキサン飽和アセトニトリルで抽出したところ、60 mL までの画分にクマホスは 95% 以上溶出し、牛脂の 94% 程度を除去することができた (表2)。なお、SPE モジュール付き Syncore Analyst を使用することで、脱脂/精製から濃縮までの操作を迅速に行うことができた。

添加回収試験: さけに多いアスタキサンチンなどのカロテノイド色素および脂肪酸を除去するために、SAX (strong anion exchange) /PSAを固相とするSPEによる追加

表2 クマホス等のlog Pow, 水溶解性, および多孔性ケイソウ土カラムからの溶出率

成分名	log Pow (20°C)	水溶解性 mg/L (20°C)	多孔性ケイソウ土カラム からの溶出率, %			
			ヘキサン飽和アセトニトリル (脱脂/精製)			
			0~20 mL	~40 mL	~60 mL	~80 mL
牛脂	-	-	2	2	2	1
クマホス	4.13	2	72	21	3	0