

精製を行って検液を得たのち、メタミドホスなど 10 種類の農薬成分は LC-MS、クマホスは GC-FPD により測定した。その結果、7 種類の試料からの回収率は、メタミドホスなど 10 種類の農薬成分（ジクロロボスは 0.1 mg/kg、他は 0.05 mg/kg 添加）で 70.9～107.4%（相対標準偏差 \leq 11.0%）、クマホス（0.01 mg/kg 添加）で 77.5～85.5%（相対標準偏差 \leq 8.5%）と概ね良好であった。

【参考文献】

- 1) 上野ら, NCI モード GC/MS およびデュアルカラム GC-マイクロ ECD による畜水産物中残留農薬の多成分分析. 食衛誌, **49**, 390-398 (2008).
- 2) 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「食品中に残留する農薬等におけるリスク管理手法の精密化に関する研究, 畜水産食品中の残留農薬の実態把握および公定試験法の検証」平成19年度総括・分担研究報告書.
- 3) 上野ら, LC-MS による農産物中デメトン-S-メチル, 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. 食衛誌, **50**, 64-69 (2009).
- 4) 小川ら, GC による農産物中のアセフェート及びメタミドホスの定量法. 食衛誌 **38**, 204-210 (1997).

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

○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

【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、昨年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、脂質など複雑な成分で構成される“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、類似の物性を有し、分析上の問題点が多いアセフェート、メタミドホスおよびオメトエートの同時分析法を検討し、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、ビーフハンバーグ、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ューエルサイエンスG-

Solid sample 10 g
Liquid sample 5 g
|
(0.5 mL each-d6 mixture as surrogate)
|
Ethyl acetate extraction
with anh. Na₂SO₄ dehydration
|
GPC
using CLNpak EV-2000 with EV-G
and acetone-cyclohexane (1:4)
|
PSA (500 mg) cartridge SPE
|
Test solution for LC-MS(/MS)

Scheme 1 Sample preparation method

Prep GPC8100システム¹⁾を用い、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/アプ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 (2mmi. d. × 150mm, 3 μ m), カラム温度: 40°C, 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 0%→10min→95%→10min→95%→0.01min→0%→20min→Stop, 流速: 0.2mL/min, 注入量: 5 μ L, イオン化法: ESIポジティブ。

【結果および考察】 本法により、水溶性の高いアセフェート (log Pow = -0.89) など を試料から効率良く抽出することができた。また、これらの農薬は比較的低分子であり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、吸着・熱分解性を有するこれらの農薬を精度良く測定するためにLC-MS(/MS)を採用した。その結果、併行精度および室内精度は良好であり、いずれの農薬も0.01ppmでの定量分析が可能と考えられた。また、サロゲート物質²⁾を用いることで、定量性をより高めることができた。

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

2) 上野英二, 食衛誌 **49**, J-309-J-313 (2008).

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

○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）

【緒言】

愛知県では食品安全対策の一環として、難分解性で環境中に残留しており、魚介類中に濃縮・蓄積されやすい PCB、有機塩素系農薬及びクロルデン類の実態調査を行ってきた。これらの汚染物質は、魚介類中では主に脂肪組織中に残留している。そのため、脂質の抽出と分離（除去）を効率良く行う必要があり、既に、脱脂・精製操作の簡易化を目的としたゲル浸透クロマトグラフィー（Gel Permeation Chromatography、以下 GPC）、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（以下シリカゲル CC）を用いた一斉分析法を報告している¹⁾。しかし、魚介類によっては、抽出される脂質が多いため追加の脱脂操作が必要となり、GC-ECD を用いた低濃度レベルの測定では、クロマトグラム上に妨害ピークが重なるなど、定量を行う上での問題点があった。

そこで今回、従来の GC-ECD に比べて、高感度で定量性に優れた GC- μ ECD を採用した上で、一斉分析法の改良を試みたので報告する。

【方法】

1. 試料

カツオ、サケ、エビ及びアサリを用いた。

2. 対象物質

PCB、有機塩素系農薬（ α -BHC、 β -BHC、 γ -BHC、 δ -BHC、アルドリン、ディルドリン、エンドリン、*pp'*-DDT、*op'*-DDT、*pp'*-DDD、

op'-DDD、*pp'*-DDE）、クロルデン類（*cis*-クロルデン、*trans*-クロルデン、オキシクロルデン、*cis*-ノナクロル、*trans*-ノナクロル、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキサイド）

3. 試験溶液の調製

自動式 GPC/SPE（装置 ジーエルサイエンス G-prep GPC 8100）を以下の条件で用い²⁾、図 1 に準じて調製した。カラム Shodex CLNpak EV2000-10E（10mm i.d.×250mm）×2 本連結、ガードカラム Shodex CLNpak EVG-8B（8mm i.d.×50mm）、カラム温度 40℃、溶出液 アセトン/シクロヘキサン（15:85）、流速 2mL/min

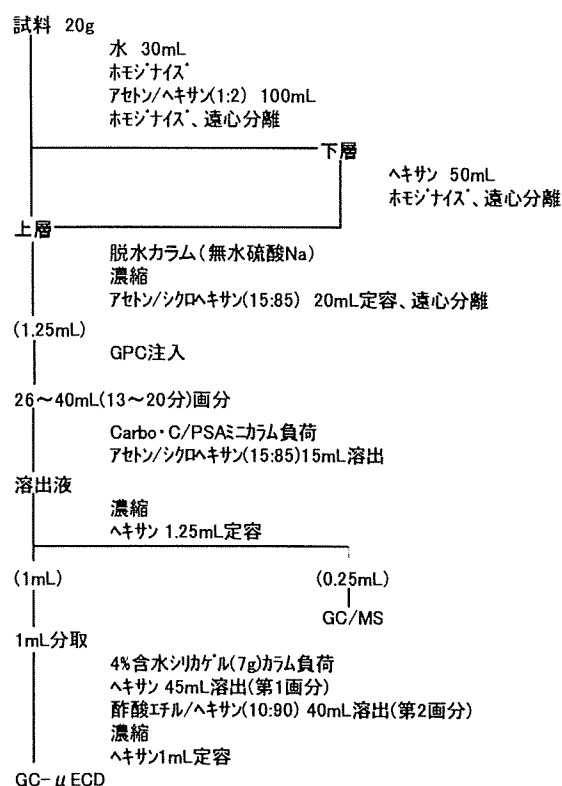


図 1. 試験溶液の調製フロー

4. 測定

デュアルインジェクション-デュアルカラム方式の GC- μ ECD (装置 Agilent 6980) を以下の条件で用い、測定した。カラム① Stx-CLPesticides (0.25mm i.d.×30m)、②Stx-CLPesticides2 (0.25mm i.d.×30m)、注入口温度 250℃、検出器温度 300℃、カラム温度 80℃ (1min) - 20℃/min- 180℃- 4℃/min- 280℃ (12min)、キャリアーガス流量 1.2mL/min、注入方式 パルスドスプリットレス (1min、300kPa)、注入量 1 μ L

【結果及び考察】

1. GPC を用いた脱脂・精製

既報¹⁾では、GPC への負荷量を試料 10g 相当としていたため、GPC カラムの保持能を超える多量の脂質が抽出される試料も少なくなかった。その場合には、ヘキサン/アセトニトリル分配による追加の脱脂操作を行う必要があった。しかし、本操作は煩雑な上に、試料によってはエマルジョンが生成するなどの問題点があった。

今回、GC の高感度化に伴い、GPC への試料負荷量を少なくできると考えられたため、より分離能の高い内径の細かいカラムへの変更も併せて検討を進めた。その結果、内径 10mm (長さ 50cm) のカラムを採用し、溶出液としてアセトン/シクロヘキサン (15:85) を用いることで、GPC への試料負荷量を 1.25g 相当と大幅に減少させることができた。これにより、追加の脱脂操作も省くことが可能となった。なお、使用する溶出液も 1 検体当たり約 65mL と従来の半分程度に削減することができた。

2. シリカゲル CC を用いた分画・精製

PCB は GC- μ ECD クロマトグラム上に多数のピークが出現するため、シリカゲル CC により、有機塩素系農薬及びクロルデン類とできるだけ分離する必要があった。

今回、均一な充てん床となり、溶出位置の再現性に優れた関東化学製のシリカゲル 60N (球状・中性 100~210 μ m) 7g を内径 10mm のオープンカラムに乾式充てんして用いた。その結果、PCB と他の汚染物質の多くを明確に分離することができた。なお、アルドリン、*pp'*-DDE を PCB と分離することができなかったが、2種類のカラムを用いる GC- μ ECD によりすべての汚染物質を分離・定量することができた。

3. 添加回収試験

4 種類の試料に対象物質 (PCB 0.05 μ g/g、有機塩素系農薬 0.005 μ g/g、クロルデン類 0.0025 μ g/g) を添加し、回収率を求めた。その結果、PCB では 109~125% (RSD \leq 10.4%)、有機塩素系農薬ではエンドリンなどを除いて 67~111% (RSD \leq 10.1%)、クロルデン類では 69~121% (RSD \leq 21.7%) と概ね良好であった。

【参考文献】

1) 梶島ら、畜水産食品中の PCBs、クロルデン類および有機塩素系農薬の一斉分析におけるゲル浸透クロマトグラフィーおよびシリカゲルカラムクロマトグラフィーの応用、愛知衛研所報, 57, 55-64 (2007)。

2) 上野ら、NCI モード GC/MS およびデュアルカラム GC-マイクロ ECD による畜水産物中残留農薬の多成分分析、食衛誌, 49, 390-398 (2008)。

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～

北九州市環境科学研究所環境研究課
 ○苗床江理、山口理香、布川 徹
 徳崎健史、森下正人

I はじめに

食品中残留農薬等のLC/MS測定への影響因子として、食品マトリックスについては周知されているが、試験液中の水については意外と知られていない。そこで今回、試験液中の水がLC/MS測定に及ぼす影響に関する試験を行ったのでその結果を報告する。

II 方法

試験 1 農薬の水溶性と試験液溶媒の含水率との関係を調べるために、市販の農薬混合標準液を含水率5段階(0,25,50,75,100%)の水/メタノール混合溶液で希釈し、20ppbの標準試験液を調製し、95種の農薬(表1参照)についてLC/MS/MS測定を実施した。

試験 2 食品マトリックスや調製法からの影響についても考察するために、精製・未精製の食品マトリックス成分を添加した試験液や試験液調製前の転溶の操作不十分を想定した微量トルエン混在試験液についても同様に調製・測定した。

(1) LC/MS試験液の調製法

試験 1 マトリックス無添加の標準試験液として、農薬混合標準液を水/メタノール混合溶媒(含水率: 0,25,50,75,100%)を用いて希釈し、各20ppbに調製。

試験 2 ① 未精製マトリックス試験液として冷凍餃子を「食品中に残留する有機リン系農薬に係る試験法(平成20年3月7日付厚労省事務連絡)」に従い得たマトリックス成分を添加し、**試験 1**と同様に調製。

試験 2 ② 精製マトリックス試験液として、カボチャを「LC/MSによる農薬等の一斉試験法(農産物)(平成17年11月25日付厚労省通知)」に従い得たマトリックス成分を添加し、**試験 1**と同様に調製。

試験 2 ③ 試験液調製前の転溶操作不十分を想定し、②の試験液1mLに50μLトルエンを添加したもの。

(2) 農薬標準試薬

林純薬工業(株)農薬混合溶液 Mix4,5,6,7の4種

(3) 測定機器条件 表2のとおり。

表2 測定機器条件

HPLC	
装置:	Waters社 Acquity UPLC System
カラム:	Waters社 Acquity UPLC BEH C ₁₈ 2.1mm × 100mm
カラム温度:	40℃
流速:	0.3mL/分 注入量: 5μL
グラジエント条件:	A:5mMCH ₃ COOH-Aq B:5mMCH ₃ COOH-MeOH
	0分 A95% → 1分 A60% → 15分 A5% → 20分 A5% → 20.5分 A95%(22分)
LC/MS	
装置:	Waters社 Quattro Premier XE
イオン化法:	ES+/ES- MRM
キャピラリー電圧:	3kV
イオン源温度:	120℃

表1 95種の対象農薬名とそのグループ分類 ※平成17年11月25日付厚労省通知別表の値

A	<p>相対保持時間*が0.8未満の農薬の11種 (比較的水溶性高のグループ)</p> <p>Aldoxycarb, Methomyl, Oxamy, Thiamethoxam, Imidacloprid, Clothianidin, Chloridazon, Oxycarboxine, Thiachloprid, Thiabendazole, Aldicarb</p>
B	<p>相対保持時間*が0.8以上1.2未満の農薬の42種 (比較的水溶性中間のグループ)</p> <p>Bendiocarb, Azamethiphos, Carbofuran, Tebuthiuron, Monolinuron, Carbaryl, Thiodicarb, Traikoxydim, Pirimicarb, Dimethirimol, Methabenzthiazuron, Furametpyr, Isoxaflutole, Azafenidin, Phenmedipham, Azinphosmethyl, Pyrifthalid, Fluridon, Fenobucarb, Azoxystrobin, Dimethomorph, Acibenzolar-S-methyl, Fenamidone, Ferimzone, Dimethomorph, Methiocarb, Boscalid, Chloroxuron, Dymuron, Iprovalicarb, Triticonazole, Epoxiconazole, Simeconazole, Flufenacet, Cumyluron, Oryzalin, Diflubenzuron, Iprodione, Cyazofamid, Naproanilide, Tebufenozide, Tetrachlorvinphos</p>
C	<p>相対保持時間*が1.2以上の農薬42種 (比較的水溶性低のグループ)</p> <p>Mepanipyrim, Fenoxycarb, Imazalil, Indanofan, Anilofos, Pyraclostrobin, Clofentezine, Triflumuron, Cyflufenamid, Pyrazolynate, Cycloate, Carpropamid, Di-allate, Indoxacarb, Quizalofop-ethyl, Novalron, Quizalofop-P-tefuryl, Aramite, Benzofenap, Teflubenzuron, Pencycuron, Furathiocarb, Lactofen, Glomeprop, Fenpyroximate, Cloquintocetmexyl, Hexaflumuron, Flufenoxuron, Cycloprothrin, Fenoxaprop-ethyl, Oxaziclofomefone, Pentoxazone, Fenpyroximate, Propaquizafop, Lufenuron, Hexythiazox, MilbectinA₃, SpinosynA, Abamectin, MilbectinA₄, SpinosynD, Tridemorph</p>

III 結果

今回、農薬の水溶性の指標に相対保持時間を採用し、表1のとおり95種の農薬をA,B,Cの3グループに分類し、個々の農薬ではなく、グループ別平均値で結果を纏めた。

試験1 (マトリックス無添加) 標準試験液

図1に、試験液含水率に対して、各農薬の相対ピーク面積(試験液含水率0%を100とした)の各農薬グループ別平均の挙動を表した。

水溶性低のグループCは、含水率50%以上から上がるにつれてピーク面積の減少の傾向を示し、含水率100%では相対ピーク面積は数%にも大幅に減少した。水溶性中間のグループBでは、その傾向はグループC程ではないものの、同様に減少傾向を示した。水溶性高のAグループは、含水率に関わらず、一定のピーク面積を保った。

試験2 精製や未精製の試験液や微量トルエン混在の試験液

精製カボチャや未精製餃子の試験液や微量トルエン混在試験液の結果の内、グループAとグループCのものについて、グループ別に図2と図3に示した。

水溶性低のグループC(図3参照)では、マトリックス無添加のものと、精製カボチャ試験液は殆ど同値を示した。未精製餃子の試験液は、含水率25~50%の範囲でマトリックス無添加よりも大幅に減少する傾向を示した。

水溶性高のグループA(図2参照)では、未精製餃子の試験液が約2割の減少傾向を示したものの、その他の試験液は全て、含水率に関わらず一定のピーク面積を保った。

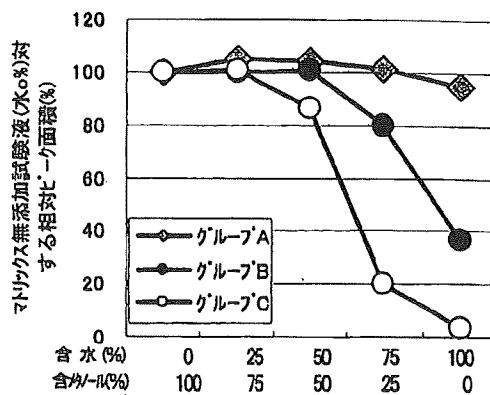


図1 マトリックス無添加標準試験液における各農薬グループの挙動

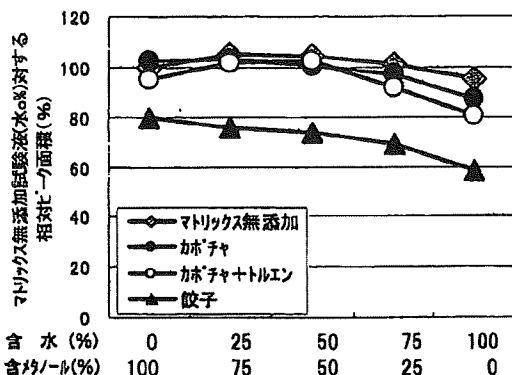


図2 農薬グループAの挙動

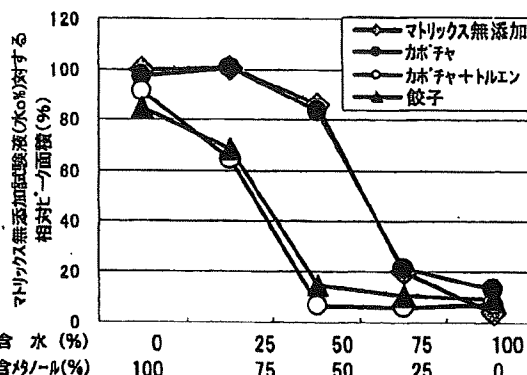


図3 農薬グループCの挙動

IV まとめ

- 1 含水率0% (メタノール100%)の試験液が食品マトリックスや他の溶剤が混在した場合であっても、農薬の水溶性に関わらず高い値となった。
- 2 水溶性低の農薬は、含水率大に伴い、容器壁等への吸着などにより減少傾向を示した。また、未精製マトリックス成分や微量トルエンが混在した場合、農薬の一部がマトリックス層やトルエン層へ移行し、更に値が減少した。
- 3 水溶性高の農薬は、含水率に関わらず値は高く安定した。但し、未精製試験液の場合は、今回約2割減少した。
- 4 「LC/MSによる農薬等の一斉試験法(農産物)」のカボチャ試験液の精製状態は良好で、標準溶液と殆ど同値であった。しかし、今回設定したトルエン溶媒除去の操作不十分の条件下では、未精製試験液レベルまで値が減少した。
- 5 これらは、農薬の水溶性を考慮したLC/MS試験液の溶媒選択が重要であると示した。含水率高い溶媒の使用には、水溶性高の農薬のみを対象の測定であれば問題は無いが、対象に水溶性低の農薬を含む測定であれば問題が生じることが示された。

国立医薬品食品衛生研究所
静岡県立大学

○坂井隆敏、村山三徳、根本 了、松田りえ子
米谷民雄

【目的】ヒドロコルチゾン (HC) は抗炎症作用を有する動物用医薬品であり、乳中0.01 ppmの暫定基準が設定されている。一方、HCは生物に広く存在する天然型ホルモンであるため、食品・添加物等の規格基準 (昭和34年厚生省告示第370号) の一般規則の8の規定 (残留基準が個別に定められていない場合、農薬等の成分である物質が自然に食品に含まれる物質と同一であるときは、対象となる食品に通常含まれる量を超えてはならない) の対象となる。そのため、HCが食品中に通常どの程度含有されているのかを把握しておくことが必要である。そこで、本研究では使用が想定される食品のうち、国産牛についてHC含有量の実態調査を行った。

【方法】調査試料として、投薬歴の明らかな食用国産牛100頭の筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓を用いた。測定は、厚生労働省通知試験法「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)」に準じて行い、HC-d4体を用いた内標準法により定量を行った。

本研究で用いた装置及び測定条件等について以下に示した。

高速液体クロマトグラフ Prominenceシリーズ HPLC (島津製作所製) ; カラム Mightysil RP-18 GP (3 μ m, 3 \times 150 mm、関東化学製) ; カラム温度 40 $^{\circ}$ C ; 移動相 0.1%ギ酸及びアセトニトリル ; 注入量 10 μ L ; 流速 0.4 mL/min ; 質量分析計 API-4000 (Applied Biosystems製) ; 測定モード

ESI+ ; 測定イオン (m/z) 363.12 \rightarrow 121.00 (HC) 及び367.12 \rightarrow 120.90 (HC-d4)

【結果及び考察】各組織のHC含有量 (中央値) は、筋肉1.3 \sim 32 ppb (7.6 ppb)、腎臓2.7 \sim 40 ppb (14 ppb)、脂肪0.2 \sim 3.7 ppb (1.2 ppb) 及び肝臓0.1 \sim 2.0 ppb (0.5 ppb) であった。

自然に含有される量の99パーセント値に相当する量の推定値として、観測された標準偏差 s と自由度を考慮した t 分布の99パーセント値 (t_{99} 値) を用いて平均値 $+t_{99}\times s$ 値を求めた場合、筋肉で24 ppb、腎臓で34 ppbとなり、実測された最大値をそれぞれ30%及び20%下回る値となった。これは、推定が正規分布を仮定しているのに対し、実際の分布は歪んでいることによるものと推察された。今回得られた結果で最も歪度の大きな肝臓において、最大値は平均値 $+t_{99}\times s$ 値の1.4倍であったことから、天然含有量の上限值としては平均値 $+t_{99}\times s$ 値に1.5或いは2.0を乗じた値が妥当と考えられる。したがって、本調査で得られた結果から、牛におけるHC天然含有量上限値は、筋肉では35 ppb或いは50 ppb、腎臓では50 ppb或いは70 ppbと推定された。

一方、脂肪及び肝臓においては、本調査で得られた全ての値が一律基準である10 ppb以下であったことから、一律基準を適用することが可能であると考えられる。

