

## 2-2) 前処理方法

福井らの方法<sup>4)</sup>に準拠した。試料 5 g をポリプロピレン製遠心管に採取し、MillQ 水を 5 mL を添加し混和させた後、30 分間室温で放置した。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。抽出液にあらかじ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 を添加し、直ちに 1 分間震とう攪拌後、遠心分離を行った。得られたアセトニトリル層 16 mL をアセトニトリル/トルエン (3/1) 30 mL でコンディショニングした ENVI-Carb/PSA 積層ミニカラムに負荷し、アセトニトリル/トルエン (3/1) 30 mL で溶出した。カラム負荷液及び溶出液をナス型フラスコに捕集後、40°C 以下で減圧濃縮し、窒素気流下で乾固した。これを 10%アセトン/ヘキサンで 4 mL に定容し、試験溶液とした (試料換算 1.0 g/mL)。

## 3. 結果及び考察

各試料の添加回収試験について、添加濃度 20 及び 100 ng/g における平均回収率及び相対標準偏差 (RSD) をそれぞれ算出した。結果の判定は福井らの方法<sup>4)</sup>に準拠し、両濃度ともに平均回収率 70-120% 且つ RSD 20% 未満の条件を満たすものを「良好な結果」と定義した。その結果、図 2 に示す通り、いずれの試料についても 250 項目以上が良好な結果となった。また、全ての試料について良好な結果を得た農薬は、219 項目であった。これらの結果から、本方法は低脂質加工食品を対象とした残留農薬一斉分析法として、有用な方法であることが示唆された。

一方で、全ての試料について、不良 (両濃度ともに平均回収率 70-120% 且つ RSD 20% 未満の条件を満たさない) と判定された農薬は、3 項目 (ジフェニル、プロベナゾール、カルボスルファン) のみであった。ジフェニルは揮発性が高く、濃縮時での損失が要因と考えられ、プロベナゾールは固相カラムでの損失が認められた。また、カルボスルファンは、前処理行程及びガスクロマトグラフの注入口において、カルボフランへの分解が認められ、これらが原因と考えられた。

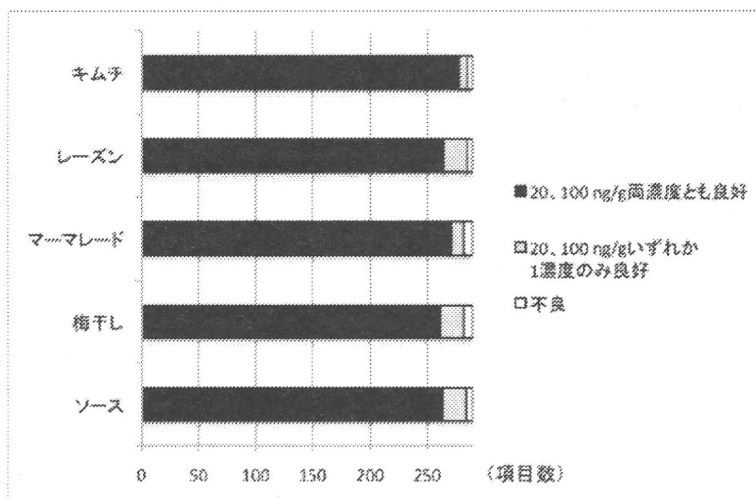


図2 添加回収試験結果

### [参考文献]

- 1) 北川 他、食品衛生学雑誌 50, 198-207 (2009)
- 2) 北川 他、食品衛生学雑誌 50, 243-252 (2009)
- 3) 岡本 他、食品衛生学雑誌 50, 10-15 (2009)
- 4) 福井 他、第 46 回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 58-59 (2009)

## LC/MS/MS を用いた飲料中の残留農薬一斉分析法の検討

○福井直樹、高取聡、北川陽子、起橋雅浩、中辻直人、  
小阪田正和、柿本幸子、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事案を契機として、加工食品中の残留農薬の検査が急務となっている。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。我々はこれまで、食品成分に着目し、脂質含有量の多い加工食品を対象とした分析法<sup>(1)</sup>ならびに糖分、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を対象とした分析法<sup>(2)</sup>を系統立てて構築してきた。このたび、飲料を対象とした分析法の構築を目的として、QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safety) 法に準拠した方法を検討した。飲料については、アルコールが分析の支障となると考えられるため、飲料中のアルコール含有量の影響を検討する目的で、市販果実飲料とエタノールを用いて、アルコール度数を多段階に調製した模擬ワインを作成し、農薬の添加回収試験を行った。さらに、農薬の残留が想定される代表的なアルコール含有飲料として、ワインを選定し市販ワイン 7種類(赤ワイン5種類、白ワイン2種類)で、構築した分析法に関して実用性の検証を行ったので報告する。

### 【2 実験方法】

#### [2-1 評価対象農薬と LC/MS/MS 測定条件]

評価対象農薬は、高取らの方法<sup>(3)</sup>に準拠し、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。LC/MS/MS の測定条件は、高取らの方法<sup>(3)</sup>に準じた。

#### [2-2 模擬ワインの調製及び前処理方法]

模擬ワインは、アルコール度数(%(v/v))が 0.5,7.5,10,12.5,15,25,40%の 8 種類になるよう、100 mL 容メスシリンダー内で、市販ぶどう果汁飲料(100%濃縮還元飲料)50 mL と残留農薬分析用エタノール及び MilliQ 水で調製した。これら調製した模擬ワイン 8 種類を用いて、添加濃度 20 ng/g で添加回収試験を行った(n=3)。試料の前処理は、試料 10 g をポリプロピレン製チューブ(50 mL)に採取し、添加濃度 20 ng/g になるよう農薬を添加した。農薬の添加 30 分間静置後、アセトニトリル 20 mL を添加し、1 分間振とう攪拌した。攪拌後、予め秤量して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 を添加し、直ちに 1 分間振とう攪拌し、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 でコンディショニングした ENVI-Carb II /PSA ミニカラムに 8 mL (模擬ワイン 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 倍希釈して試験液とした。

#### [2-3 市販ワインの添加回収試験]

赤ワイン 5 種類(アルコール度数 11,13,13.5,14,14.5%)及び白ワイン 2 種類(アルコール度数 13,14%)、計 7 種類の市販ワインを用いた。添加濃度がそれぞれ 40 ng/g になるよう市販ワインに農薬を添加し、添加回収試験を行った(n=5)。添加回収試験は、試料 5 g 採取後、MilliQ 水 5 mL で希釈後に、アセトニトリルによる

抽出を行った場合と、試料 10 g 採取後、MilliQ 水で希釈しないで抽出を行った場合の両方で行い、結果を比較した。なお、試験液のマトリクス濃度が、ともに 0.25 mg/L になるよう調製した。

### 【3 結果及び考察】

多種類の飲料(アルコール含有飲料及び非含有飲料)を用いた添加回収試験の予備検討において、アルコール度数の増加に伴い、回収率が 70~120%になる農薬項目数は減少した。特に、アルコール度数が高いウイスキーやブランデーは減少が顕著であった。このことから、模擬ワインで、アルコールの影響を検討し、その結果を表 1 に示した。アルコール度数 0%の模擬ワインで、良好な項目(回収率 70~120%及び相対標準偏差が 20%未満)は 84 項目あった。今回対象とした農薬類に関しては、アルコール度数 0%~25%の範囲では、アルコール度数の増加に伴い良好な項目数の大きな変動は認められなかったが、アルコール度数 40%の模擬ワインでは 57 項目まで低下した。さらに、8 種類の模擬ワインで良好な農薬項目の平均回収率を算出したところ、アルコール度数の増加に伴って、平均回収率は 91%(アルコール度数 0%)から 76%(アルコール度数 40%)まで漸次的に低下した。次に、アルコール含有飲料での実用化検証のため、市販ワインで、アルコール度数を変えて添加回収試験を行ったところ、7 種類すべてのワインで、アルコール度数を約 2 倍に希釈(ワイン 5 g を 5 mL の水で希釈)して抽出した方が、ワイン原液(ワイン 10 g)で抽出するよりも、それぞれ良好な農薬項目の平均回収率が 100%に近い結果となった。また、希釈しないでワイン原液(アルコール度数 11~14.5%)で抽出した場合、7 種類すべてのワインで共通して良好な項目数は 75 項目で、これら良好項目の平均回収率は 83%であった。一方、ワイン原液を約 2 倍に希釈したうえで抽出した場合、7 種類すべてのワインで共通して良好な項目数は 78 項目で、これら良好項目の平均回収率は 87%であった。これらの結果から、構築した分析法は、ワインの農薬分析に有効であることが示唆され、また、アルコール含有飲料はアルコール低度数に希釈して抽出することにより、回収率の改善が見込まれることが推察された。

表 1 模擬ワイン(100mL)の組成及び添加回収試験結果の概要

アルコール度数(%)	0	5	7.5	10	12.5	15	25	40
ぶどう果汁飲料(mL)	50	50	50	50	50	50	50	50
エタノール量(mL)	0	5	7.5	10	12.5	15	25	40
マトリクス濃度(g/mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
良好な項目数(※)	84	85	81	83	84	82	78	57
良好項目の平均回収率(%)	91	89	90	87	87	85	79	76

(※) 良好な項目は、回収率 70~120%及び相対標準偏差(RSD)が 20%未満(試行数 3)

- (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) 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; 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講演集, 58~59 (2009)
- (3) 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)

## A-5

### 国産牛中のヒドロコルチゾン含有量実態調査

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肉用国産牛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  $\mu$ 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  $\mu$ 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パーセンタイル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  $\text{平均値} + t_{99} \times s$  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  $\text{平均値} + t_{99} \times s$  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  $\text{平均値} + t_{99} \times s$  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。

## 特定原材料検査に関する外部精度管理の実施に向けた検討

○笠間菊子<sup>1</sup>、小熊恭代<sup>1</sup>、鈴木達也<sup>1</sup>、穂山浩<sup>2</sup>、大島赴夫<sup>1</sup>、小島幸一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>食品薬品安全センター、<sup>2</sup>国立医薬品食品衛生研究所

【目的】アレルギー物質を含む特定原材料（卵、乳、小麦、そば、落花生、えび、かに）については食品への表示が義務付けられており、検査法が通知されている。特定原材料検査の精度の適正化および向上のためには外部精度管理の実施が必要と考えられ、実施に向けて調査試料の作製が課題となっている。我々は厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進事業）「検査機関の信頼性確保に関する研究」において特定原材料検査の外部精度管理の実施を目指して、特定原材料検査に関する外部精度管理試料調製法の検討を行ってきた。今回、卵を含む試料について配布を想定した規模での試料調製ができたことから、外部精度管理の模擬試験を実施したので報告する。

【方法】特定原材料のうち卵を食材に混合し、均質な試料を数種調製した。調製試料はそれぞれについてELISA測定により均一性を確認後、参加機関への配布試料とした。さらに試験期間終了後にも再度測定を実施し、安定性を確認した。外部精度管理の模擬試験においては、プロトコール、アンケートおよび報告書の書式を作成し、試料と共に送付した。参加機関から報告された各試料の測定値はzスコアの算出およびXbar-R管理図の作成により解析した。さらに、ELISA解析ソフトウェアによる誤差を検討するため、吸光度

データから当所で所有するELISA解析ソフトウェアを使用して定量値を再計算し、この値からもzスコアを算出した。

【結果および考察】模擬試験用試料各10本のELISA測定値を一元配置による分散分析により解析した結果、いずれの試料も均一と判定された。また、試験期間終了後に試料を再度測定し、安定性を検討した結果、測定値は均一性試験の87.3から111.8%の範囲であった。外部精度管理の模擬試験の実施においては、試料の配送を含めトラブル等の報告はなかった。各機関の報告値と所有するELISA解析ソフトウェアによる再計算値とを比較した結果、定量値が必ずしも完全に一致しないことが判明したが、多くの場合その差はわずかであった。しかし特定のELISA解析ソフトウェアでは差が大きく、表示のための特定原材料の混入判定の閾値（ $10\mu\text{g/g}$ ：特定原材料タンパク質量/食品重量）付近では、平均値の差が10%程度に達した。この差は精度管理結果にも影響を及ぼすことが報告値と再計算値から得られたzスコアの比較から明らかになった。なお、参加機関の測定値をXbar-R管理図により解析した結果、1機関を除き問題のある測定値はなかった。以上の結果、今回調製した卵を含む試料を用いて外部精度管理が実施可能であることが示唆された。



