

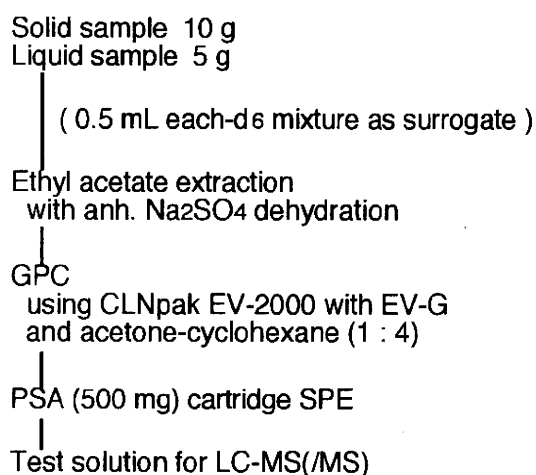
畜水産食品中アセフェート、オメトエートおよび メタミドホスの分析

○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ーエルサイエンスG-



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 (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 0%→10min→95%→10min→95%→0.01min→0%→20min→Stop, 流速：0.2mL/min, 注入量：5 μL, 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分子量が低くGPCでの溶出が遅いため、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シサイド）

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°C、溶出液 アセトン/シクロヘキサン（15:85）、流速 2mL/min

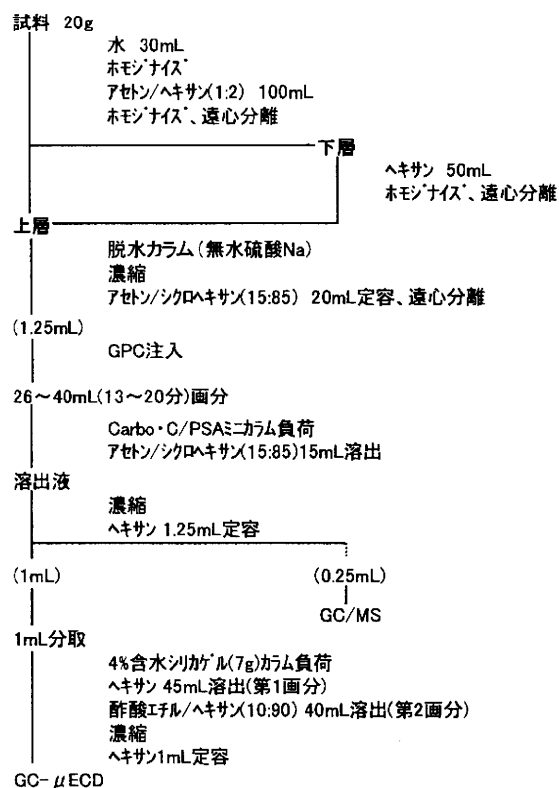


図 1. 試験溶液の調製フロー

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2① 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2② 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2③ 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	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) Aldoxycarb, Methomyl, Oxamy, Thiamethoxam, Imidacloprid, Clothianidin, Chloridazon, Oxycarboxine, Thiacloprid, Thiabendazole, Aldicarb
B	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) Bendiocarb, Azamethiphos, Carbofuran, Tebuthiuron, Monolinuron, Carbaryl, Thiodicarb, Tralkoxydim, 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
C	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) Mepanipyrim, Fenoxycarb, Imazalil, Indanofan, Anilofos, Pyraclostrobin, Clofentezine, Triflumuron, Cyflufenamid, Pyrazolynate, Cycloate, Carpropamid, Di-allate, Indoxacarb, Quizalofop-ethyl, Novalon, Quizalofop-P-tefuryl, Aramite, Benzofenap, Teflubenzuron, Pencycuron, Furathiocarb, Lactofen, Glomeprop, Fenpyroximate, Cloquintocetmexyl, Hexaflumuron, Flufenoxuron, Cycloprothrin, Fenoxaprop-ethyl, Oxaziclofome, Pentoxazone, Fenpyroximate, Propaquizafop, Lufenuron, Hexythiazox, MilbectinA ₃ , SpinosynA, Abamectin, MilbectinA ₄ , SpinosynD, Tridemorph

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。

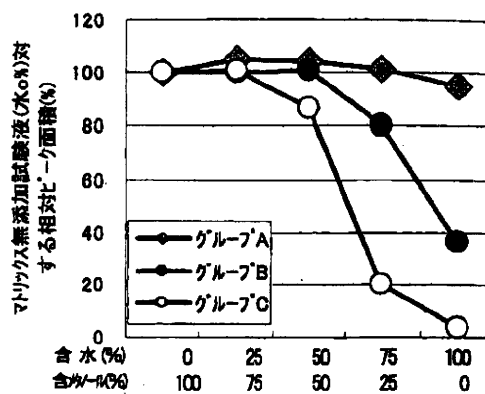


図1 マトリックス無添加標準試験液における各農薬グループの挙動

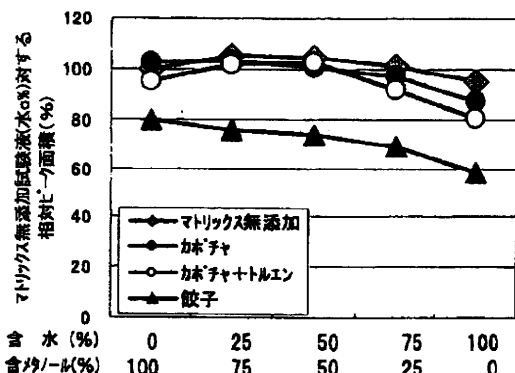


図2 農薬グループAの挙動

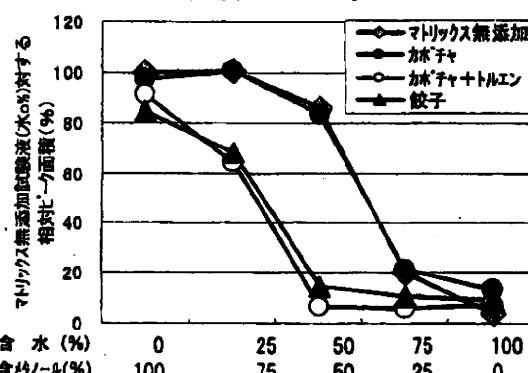


図3 農薬グループCの挙動

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。

GC/MS/MS を用いた加工食品中の残留農薬の一斉分析法の検討

—農産物を主原料とした加工食品を中心に—

北川陽子、起橋雅浩、高取 聡、福井直樹、
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. はじめに

平成 20 年初頭に発覚した「冷凍餃子への有機リン系農薬混入事件」を契機に、消費者の加工食品に対する不安が高まり、加工食品中の残留農薬分析が重要視されるようになった。加工食品は生鮮食品以外の全ての食品が該当するため、全ての加工食品を単一の分析法で網羅することは困難である。加工食品中の残留農薬を精度よく分析するためには、図 1 に示すように加工食品を系統的に分類し、その分類に応じた分析法を開発することが重要である。

我々はこれまでに、餃子など高脂質食品を対象とした分析法を構築した¹⁻³⁾。さらに、LC/MS/MS で測定可能な農薬に重点をおき、農産物を主原料とした低脂質加工食品を対象とした分析法の検討を行い、昨年の第 46 回全国衛生化学技術協議会年会で報告した⁴⁾。本研究では、昨年と同じ低脂質加工食品を対象に、GC/MS/MS で分析可能な農薬について検討したので報告する。

2. 方法

2-1) 評価対象農薬、試料及び添加回収試験

GC/MS/MS で分析可能な 291 項目（塩素系農薬、含窒素系農薬、有機リン系農薬、ピレスロイド系農薬等）を評価対象農薬として検討を行った。これら農薬の混合標準溶液を調製し、アセトンで希釈したものを添加回収試験及び検量線の作成に用いた。

添加回収試験は、低脂質加工食品を対象とし、図 1 に示した 5 種類の試料（マーマレード、レーズン、キムチ、梅干し、ウスターソース）について検討を行った。各試料について 2 濃度の添加濃度（20 及び 100 ng/g）の回収試験を行い、GC/MS/MS で測定を行った（試行数 5）。

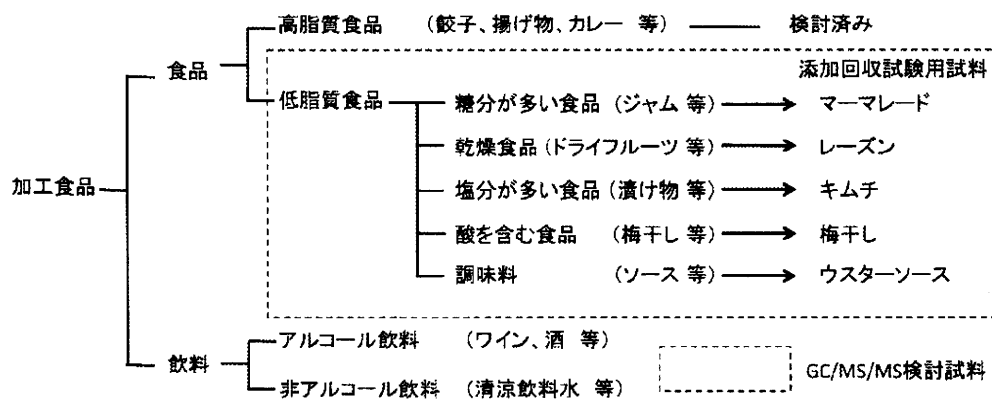


図1 加工食品の系統的分類

2-2) 前処理方法

福井らの方法⁴⁾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℃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⁴⁾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。

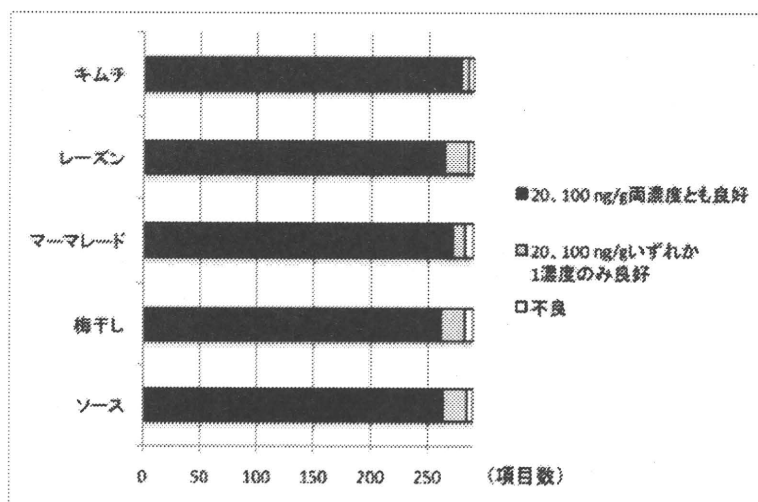


図2 添加回収試験結果

[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⁽¹⁾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⁽²⁾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⁽³⁾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⁽³⁾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)

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

○齊藤 貢一¹, 馬場 奈美季¹, 岩崎 雄介¹, 伊藤 里恵¹, 細江 智夫¹,
河合 賢一¹, 中澤 裕之¹

(¹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。

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 μ m、3×150 mm、関東化学製）；カラム温度 40℃；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→121.00（HC）及び367.12→120.90（HC-d4）

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

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製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¹⁾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ビーフン 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、ビーフン 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 GM quicker2(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、GM quicker2 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

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¹、小熊恭代¹、鈴木達也¹、穠山浩²、大島赴夫¹、小島幸一¹

¹食品薬品安全センター、²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。

