

第3章 調査研究・報告

第1節 原 著

総アフラトキシン検査体制の確立と実態調査

竹田依加・南浦茉奈・上床知佐奈・中永絵理・安藤尚子・米田正樹・上眞佐美

Establishing the Analysis of Total Aflatoxins and Examination of That Contamination in Foods in Nara Prefecture

Erika TAKEDA・Mana MINAMIURA・Chisana UWATOKO・Eri NAKAE・Naoko ANDO・Masaki YONEDA and Masami KAMI

多機能カラムを用いた総アフラトキシン試験法について検討し、ピーナッツ、クルミおよび大豆を対象とした試験法を確立した。奈良県内で流通するピーナッツ、クルミおよび大豆を対象とし、7市町(奈良市、大和郡山市、天理市、橿原市、桜井市、五條市および田原本町)で購入した全 21 件について確立した試験法を用いて総アフラトキシン含有量の簡易的な実態調査を実施したところ、全ての食品で総アフラトキシンは検出されなかった。

緒言

アフラトキシン(以下、AFと呼ぶ)は熱帯・亜熱帯地域に生息する *Aspergillus* 属のカビが産生するカビ毒の一種である。代表的な汚染食品は特にピーナッツおよびクルミといった種実類や豆類等である。

AF は天然物質の中で発がん性が強く、世界的に見て食品への汚染が広く発生していることから各国で基準値が設けられている¹⁾。日本での規制対象物質は、従来最も毒性が強い AFB₁のみであったが、平成 23 年 3 月 31 日付け食安発 0331 第 5 号により、AFB₁、AFB₂、AFG₁および AFG₂の総和である総 AF に変更された。総 AF を 10 µg/kg を超えて検出する食品は全て食品衛生法第 6 条第 2 号に違反するものとして取り扱われる。

AF に関する試験法は昭和 46 年に AFB₁のみを対象とした薄層クロマトグラフ法が確立された。その後、総 AF を対象とした試験法が平成 23 年 8 月 16 日付け食安発 0816 第 1 号「総アフラトキシンの試験法について」(以下、通知法と呼ぶ)で通知され、多機能カラムまたはイムノアフィニティカラムを用いた 2 種類の方法が示された。多機能カラムは逆相やイオン交換等の複数の充填剤を混合したカラムであり、イムノアフィニティカラムよりも安価で、短時間の精製で迅速な分析が可能である。また、使用前のカラムのコンディショニングが不要といった特徴がある。しかし、精製後のクロマトグラムには夾雑ピークが混入しやすいといった欠点がある。一方、イムノアフィニティカラムは AF に対する抗体をカラムに固定する免疫学的手法で作製されており、夾雑ピークが非常に少ないクロ

マトグラムが得られる。しかし、高価で使用期限があるといった欠点がある²⁾。また、多機能カラムに比べ、抽出・精製工程も煩雑である。

AF が天然物質の中で毒性が強いことや身近な食品が汚染対象で、汚染事例が多いことから、AF による健康被害を防止するために、各都道府県でも試験法の検討が進められている³⁻⁷⁾。本県でも総 AF の検査体制を確立し、県内流通食品について総 AF 含有量の実態を把握することが急務である。そこで本研究では、主な汚染対象となる食品を中心に、抽出・精製工程が簡便であり、迅速な検査が期待できる多機能カラムを用いた試験法を検討した。検討した試験法の妥当性評価を実施し、迅速で定量可能な試験法の確立を目的とした。また、確立した試験法を用いて、県内で流通する食品に含まれる総 AF 含有量の実態を調査した。

方法

1. 検査対象食品

検査対象食品は厚生労働省の輸入食品違反事例に報告があり、昭和 46 年 3 月 16 日付け環食第 128 号「カビ毒(アフラトキシン)を含有する食品の取り扱いについて」または通知法に記載があるピーナッツ、クルミおよび大豆を採用した。検査を行う場合は試験部位をミキサーやフードプロセッサーであらかじめ粉砕均一化して用いた。

2. 試薬等

1) 標準品

総 AF の測定には富士フィルム和光純薬(株)製 AF 混合標準溶液を用いた。AF 混合標準溶液は AFB₁、

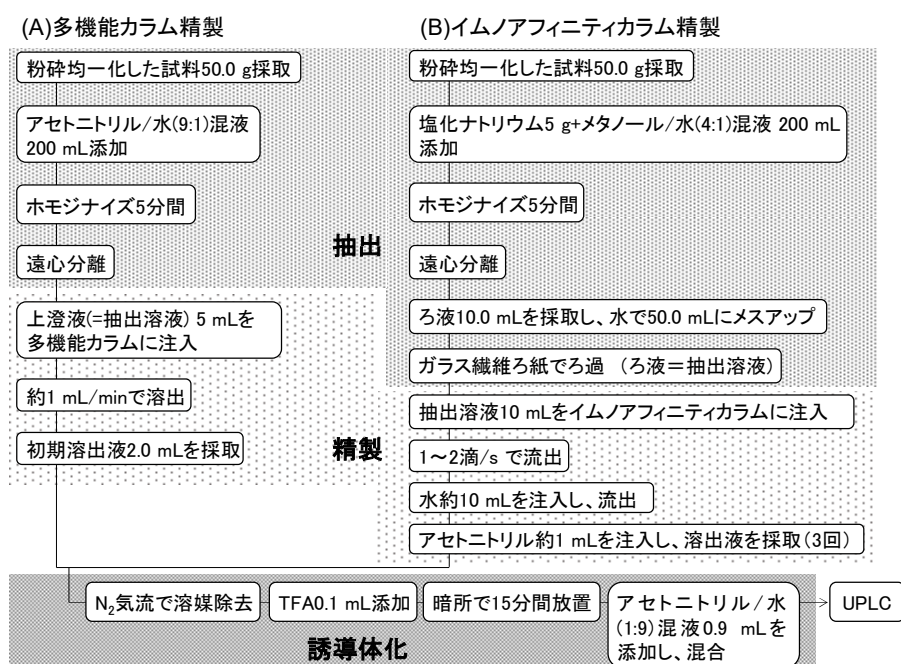


図 1 総アフラトキシンの試験フロー

AFB₂, AFG₁ および AFG₂ を各 25 µg/mL ずつ含有していた。

2) 標準液

AF 混合標準液は各 AF 濃度が 2.5 µg/mL になるよう標準品をアセトニトリルで希釈して使用した。

3) 精製カラム

(1) 多機能カラム

多機能カラムはジーエルサイエンス (株) 製 InertSep VRA-1, InertSep VRA-3, Romer 社製 MultiSep #226, MultiSep #228, シグマアルドリッチ社製 Supel Tox AflaZea および昭和電気 (株) 製 Autoprep MF-A1000 を使用した。

(2) イムノアフィニティカラム

イムノアフィニティカラムは Romer 社製 AflaStar R を使用した。イムノアフィニティカラムは使用前に次のとおりコンディショニングした。まず、カラム内の液を全て排出した後、カラムに生理的リン酸緩衝液 (以下、PBS と呼ぶ) を満たし、これを全て排出した。この後、再度カラムに PBS を満たし、カラム容量の半分程度の量の PBS が残るまで流出させた。PBS は塩化カリウム 0.20 g, リン酸二水素カリウム 0.20 g, リン酸水素二ナトリウム・12 水和物 2.92 g および塩化ナトリウム 8.00 g を水 900 mL 程度に溶解し、pH7.4 とした後、水で 1 L にメスアップした。

4) その他試薬等

各種溶液調製等に使用したアセトニトリルは富士フィルム和光純薬 (株) 製、残留農薬分析用を、メタノールは富士フィルム和光純薬 (株) 製、残留農薬分析

用を用いた。PBS 調製に用いた塩化カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナトリウム・12 水和物および塩化ナトリウムはいずれも富士フィルム和光純薬 (株) 製、試薬特級であった。誘導体化試薬として用いたトリフルオロ酢酸 (以下、TFA と呼ぶ) は富士フィルム和光純薬 (株) 製、和光特級であった。ガラス繊維ろ紙は ADVANTEC 社製 GA-100 を用いた。

3. 試験溶液の調製

1) 多機能カラム精製

(1) 抽出工程

試験溶液の調製方法を図 1 (A) に示した。粉砕均一化した試料 50.0 g をホモジナイザーカップに採取した。アセトニトリル/水 (9:1) 混液 200 mL を加え、ホモジナイザーで 5 分間抽出した。次に、ポリプロピレン製容器に抽出後の試料と溶液を合わせて移し、3500 rpm で 15 分間遠心分離した。遠心分離後の上澄液を抽出溶液とした。

(2) 精製工程

カラムに抽出溶液 5 mL を負荷し、カラムから流速 1.0 mL/min で溶出させ、初期溶出液 2.2 mL 程度を採取した。採取した溶出液から 2.0 mL を改めて分取し、精製溶液とした。

2) イムノアフィニティカラム精製

(1) 抽出工程

試験溶液の調製方法を図 1 (B) に示した。粉砕均一化した試料 50.0 g をホモジナイザーカップに採取した。塩化ナトリウム 5.0 g およびメタノール/水 (4:1) 混液 200 mL を加え、ホモジナイザーで 5 分間抽出し

た。次に、ポリプロピレン製容器に抽出後の試料と溶液を合わせて移し、3500 rpm で 15 分間遠心分離した。遠心分離後の上澄液を 10.0 mL 採取し、水で 50 mL にメスアップした。十分混合した後、ガラス繊維ろ紙を用いてろ過し、これを抽出溶液とした。

(2) 精製工程

抽出溶液 10.0 mL をコンディショニング済みのイムノアフィニティカラムに注入し、毎秒 1~2 滴の流速でカラムから流出させた。次に、水約 10 mL を複数回に分けてカラムに注入し、流出させた。最後にアセトニトリル 1 mL をカラムに注入し、自然落下で溶出させる工程を 3 回実施した。アセトニトリルによる溶出液をすべて採取し、これを精製溶液とした。

3) 誘導体化工程

精製溶液を 45℃以下の加温状況下で N₂ ガスを用いて溶媒除去後、TFA 0.1 mL を加え、再溶解させてから混合した。その後速やかに暗所で 15 分間静置し、アセトニトリル/水 (1:9) 混液 0.9 mL を加えて混合した。これを 0.2 μm メンブレンフィルターでろ過し、最終検液とした。

4. 器具および機器

検体の粉碎に用いたミキサーは松下電器産業 (株) 製、ファイバーミキサー-MX-X107、フードプロセッサは TOSHIBA 製、ミキシングカッター-CQM-V2 であった。また、ホモジナイザーは NIHONSEIKI KAISHA 製、Ace HOMOGENIZER で、遠心分離機はエッペンドルフ・ハイマック・テクノロジーズ (株) 製、高速冷却遠心機 CR21 を用いた。測定に用いた超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) は Waters 社製、ACQUITY UPLC H-Class であり、蛍光検出器 (FL) は Waters 社製、ACQUITY UPLC FLR Detector であった。

5. 測定条件

UPLC-FL による測定条件を表 1 に示した。

表 1 UPLC-FL 測定条件

検出器	蛍光検出器(FL) (励起365 nm, 蛍光450 nm)
移動相	メタノール : アセトニトリル : 水 = 3 : 1 : 6
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 2.1 mm×100 mm, 1.7 μm
カラム温度	40℃
注入量	3 μL
流速	0.15 mL/min
測定時間	10 min

6. 検量線

検量線用標準液は各 AF 濃度が 0.5, 1.25, 2.5, 5, 10 ng/mL となるように、AF 混合標準液をアセトニトリルで希釈した。調製した検量線用標準液 1.0 mL を

45℃以下の加温状況下で N₂ ガスを用いて溶媒除去後、TFA 0.1 mL を加え、再溶解させてから混合した。その後速やかに暗所で 15 分間静置し、アセトニトリル/水 (1:9) 混液 0.9 mL を加えて混合し、これを測定した。

7. 妥当性評価

妥当性評価は通知法および平成 19 年 11 月 15 日付け食安発第 1115001 号「食品に残留する農薬等に関する試験法の妥当性ガイドラインについて」(以下、妥当性評価ガイドラインと呼ぶ) に基づき、各検査対象食品に対し、それぞれ試験者 1 人、1 濃度、2 併行、5 日間で添加回収試験を実施した。添加回収試験では AF を含まないピーナッツ、クルミおよび大豆に対し、各 AF 濃度が 2.5 μg/kg となるように AF 混合標準液をそれぞれ添加した。

得られた結果より選択性を確認し、真度、併行精度および室内精度を求め、通知法に従い評価した。選択性は夾雑ピーク面積が各 AF 濃度 1.25 ng/mL に相当するピークの面積と比較し、1/10 未満であることが求められた。また、真度、併行精度および室内精度の目標値はそれぞれ 70%~110%、20%≧および 30%≧であった。

8. 県内に流通する食品中の総 AF 含有量の実態調査

奈良県内で流通するピーナッツ、クルミおよび大豆について簡易的なスクリーニング検査を実施し、県内流通品の総 AF 含有量の実態を把握した。調査対象は奈良盆地内を中心に流通量が多い大型商業施設や身近にあるスーパーマーケット等にある食品とした。対象市町村は奈良市、大和郡山市、天理市、橿原市、桜井市、五条市および田原本町の 7 市町であり、総店舗数 16 店、総検査食品数は 21 件であった。

結果および考察

1. 多機能カラムを用いた総 AF 試験法の検討

1) UPLC-FL 測定条件の検討

通知法を参考に、迅速性を重視して UPLC による測定を試みた。流速および注入量をそれぞれ 0.1~0.2 mL/min, 1~5 μL と変更して測定条件を検討した。分離度、シンメトリー係数およびピーク形状等より、UPLC-FL の測定条件を表 1 のとおり決定した。表 1 の測定条件で各 AF について 0.5~10 ng/mL の範囲で検量線を作成したところ、図 2 に示すような R²=0.999 以上の高い直線性が得られた。また、定量限界は各 AF について 1.0 μg/kg であった。

2) 精製方法の検討

(1) 多機能カラムの選定

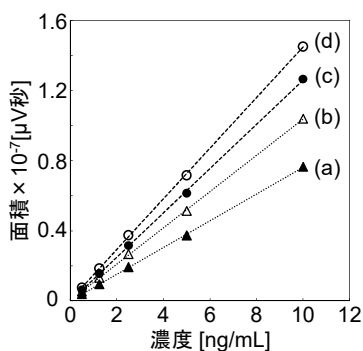


図2 検量線

(a) AFG₁ (b) AFG₂ (c) AFB₁ (d) AFB₂

図1 (A) に示すフローに従い、AF を含まない大豆を用いて、6 種類の多機能カラムでそれぞれ精製を行い、クロマトグラムを得た。添加回収試験では妥当性評価の添加濃度より各 AF 濃度が 2.5 μg/kg となるように AF 混合標準液を大豆に添加し、回収率を得た。クロマトグラムおよび回収率を比較し、最適なカラムを選定した。

図3 に示すように、各カラムで精製したクロマトグラムを比較すると、MultiSep #226 および MultiSep #228 を用いた場合に最も夾雑ピークが除去されることがわかった。次に表2 に示す添加回収試験の結果より、InertSep VRA-3, MultiSep #226 および MultiSep #228 を用いた場合にすべての AF について通知法に示されている妥当性評価の目標値である回収率 70% ~ 110% を満たした。また、MultiSep #228 の回収率

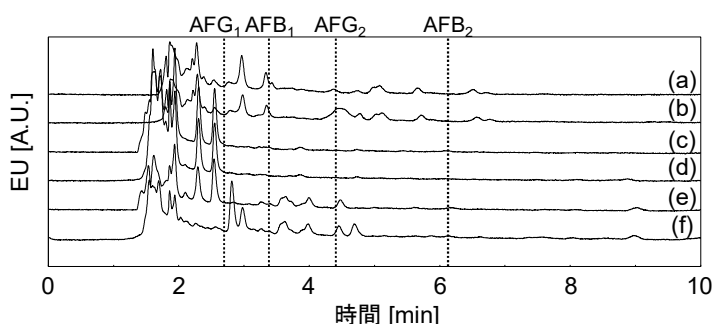


図3 多機能カラムによる夾雑ピーク除去の様子

(a) InertSep VRA-1 (b) InertSep VRA-3
(c) MultiSep #226 (d) MultiSep #228
(e) Supel Tox AflaZea (f) Autoprep MF-A1000

表2 各多機能カラム精製の回収率

物質名	(a)InertSep VRA-1	(b)InertSep VRA-3	(c)MultiSep #226	(d)MultiSep #228	(e)Supel Tox AflaZea	(f)Autoprep MF-A1000
	回収率 [%]					
AFB ₁	104.0	102.2	81.9	93.7	81.9	101.5
AFB ₂	100.4	97.3	87.0	97.6	86.4	97.2
AFG ₁	115.8	109.1	72.9	93.0	69.0	116.1
AFG ₂	111.7	109.0	80.0	95.4	76.8	109.4

93.0%~97.6%の方が MultiSep #226 の回収率 72.9% ~ 87.0% よりも良好であった。以上の結果から、夾雑ピークがよく除去され、回収率の結果が良好である MultiSep #228 を使用することとした。

(2) 夾雑ピークの影響

多機能カラム MultiSep #228 で添加回収試験を実施した際、図4 に示すように AFG₁ のピーク付近に夾雑ピークが見られた。そこで、AFG₁ のピークと夾雑ピークの分離を実施し、夾雑ピークの影響を検討した。ピーク分離の方法はガウス分布を用いたカーブフィッティング法および UPLC 解析ソフト (Empower 3) による垂直分割法を実施した。

ガウス分布を用いたカーブフィッティング法では式 (1) を用い、夾雑ピークおよび AFG₁ ピークをそれぞれ作成した。それらを合算したピークを実際の測定結果にフィッティングさせた。

$$y = H \cdot \exp \left\{ -\frac{(x-\mu)^2}{2\delta^2} \right\} \quad \dots (1)$$

ここで、定数 H はピーク高さ、 μ はピーク位置、 δ はピーク幅を示している。

カーブフィッティングを実施した結果を図5 に示した。測定結果に良好にフィッティングされており、夾雑ピークと AFG₁ ピークが分離できた。分離した AFG₁ ピークの面積から回収率を算出した。表3 に示すように、カーブフィッティングおよび UPLC 解析ソフトによる垂直分割法から得られた AFG₁ の回収率がほぼ同値であったことから、夾雑ピークが微小でピークトップが分離している場合、UPLC 解析ソフトによる垂直分割法のピーク分離が有効であるといえる。一方、ピーク分離を実施した2つの場合は分離しなかった場合に比べて AFG₁ の回収率の低下は 5% 程度であった。加えて、夾雑ピークの面積が微小で、妥当性評価の選択性を満たしていたため、夾雑ピークの影響は微小であると判断した。

(3) カラムからの夾雑物の溶出状況

多機能カラムで精製する場合、AF を通過させ、カラムで夾雑物を保持する。しかし、夾雑物保持容量の超過やカラム内の充填剤と夾雑物の相互作用の関係により、溶出液中に夾雑物が混入する。このため、カラムからの夾雑物の溶出状況を知ることは重要である。そこで、図1 (A) に示すフローに従い、大豆から得た抽出溶液を多機能カラム MultiSep #228 に負荷し、カラムからの溶出液を 1 mL ずつ 3 mL 目まで採取した。採取した溶出液を誘導体化し、測定した。このとき、誘導体化には TFA0.05 mL およびアセトニトリル/水 (1:9) 混液 0.45 mL を用いた。

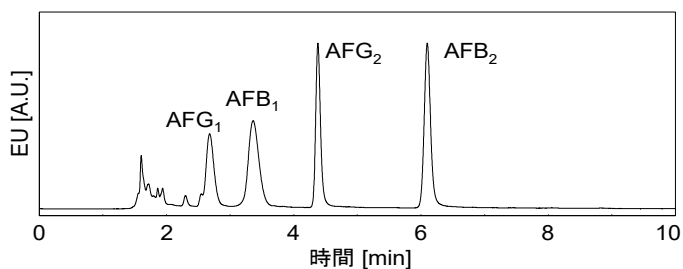


図4 添加回収時のクロマトグラム例
(多機能カラム MultiSep #228)

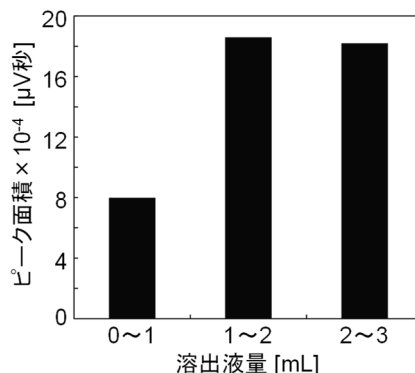


図6 溶出液量と主要夾雑ピーク面積の関係

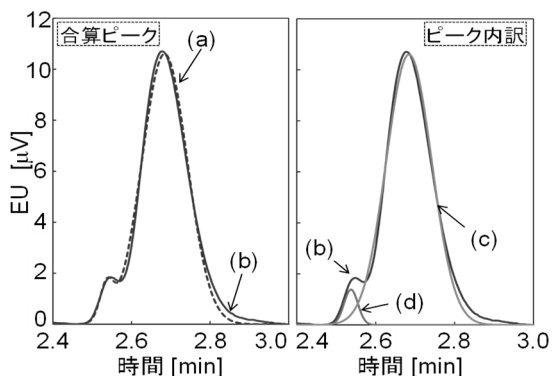


図5 カーブフィッティングによるピーク分離
(a) フィッティングしたピーク (b) 測定結果
(c) AFG₁ ピーク (d) 夾雑ピーク

表3 AFG₁回収率の比較

AFG ₁ ピークの分離法	AFG ₁ 回収率[%]
ピーク分割なし	93.0
カーブフィッティング	87.7
垂直分割法	86.9

クロマトグラムの結果より、夾雑物が徐々に溶出する様子が確認できたが、さらに夾雑物の溶出状況を確認しやすくするため、図3(d)で溶出時間2~3分程度に見られるような2本の夾雑ピーク(以下、主要夾雑ピークと呼ぶ)のピーク面積の合計を溶出液量1 mLごとに比較した。

図6に示すように、主要夾雑ピーク面積は溶出液量2 mLまでは増加傾向がみられ、溶出液量2 mL以上ではほぼ一定となった。これより溶出液量2 mL以降について当該カラムでの夾雑保持等が困難であるといえる。ゆえに初期2 mLの精製が良好であることが確認

できた。

2. 妥当性評価結果

ピーナッツ、クルミおよび大豆について、選択性の評価を実施した。図7に示すように、各AF濃度1.25 ng/mLの場合に得られたピーク面積の1/10以上に相当する面積の夾雑ピークはそれぞれ認められなかった。また、真度、併行精度および室内精度の評価結果を表4に示した。各AFに対し、ピーナッツでは真度は97.0%~102.0%であり、併行精度は1.2%~3.8%、室内精度は2.7%~5.3%であった。クルミでは真度は92.3%~97.3%であり、併行精度は1.6%~3.2%、室内精度は4.5%~6.9%であった。また、大豆では真度は96.1%~99.5%であり、併行精度は2.1~3.7%、室内精度は2.5%~6.2%であった。以上より、ピーナッツ、クルミおよび大豆に対し、本試験法で各AFについて、いずれも目標値を満たす良好な結果が得られた。

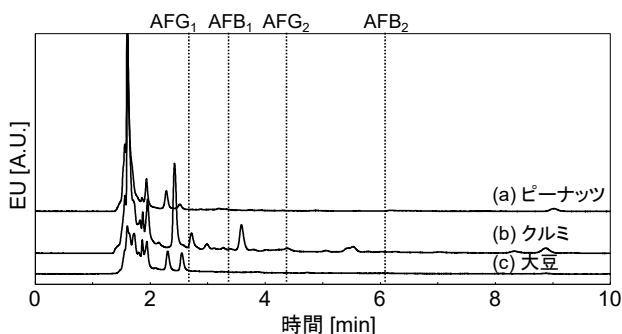


図7 各食品のクロマトグラム

表4 真度、併行精度および室内精度の評価結果

(a) ピーナッツ					(b) クルミ					(c) 大豆				
物質名	真度[%]	併行精度[%]	室内精度[%]	判定	物質名	真度[%]	併行精度[%]	室内精度[%]	判定	物質名	真度[%]	併行精度[%]	室内精度[%]	判定
AFB ₁	99.0	2.1	4.4	○	AFB ₁	97.1	3.2	5.5	○	AFB ₁	96.1	3.1	2.6	○
AFB ₂	102.0	1.2	2.7	○	AFB ₂	92.3	2.1	6.9	○	AFB ₂	99.5	2.1	2.6	○
AFG ₁	97.0	3.8	5.3	○	AFG ₁	95.4	2.3	5.1	○	AFG ₁	97.0	3.7	6.2	○
AFG ₂	101.4	1.6	3.5	○	AFG ₂	97.3	1.6	4.5	○	AFG ₂	99.2	2.9	2.5	○
目標値	70~110	20≥	30≥		目標値	70~110	20≥	30≥		目標値	70~110	20≥	30≥	

3. 奈良県内に流通する食品の総AF含有量の実態調査

1. 2) (1)より決定した多機能カラム MultiSep #228を用いた試験法で奈良県内に流通するピーナッツ、クルミおよび大豆について総AF含有量の簡易的な実態調査を実施した。図1(A)に示すフローに従い、検査を実施した結果、表5に示すように、すべての検体において総AFは検出されなかった。

表5 県内流通食品の実態調査結果

食品名(検体数)	産地	各AF濃度 [μg/kg]			
		AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
ピーナッツ (3)	アメリカ・中国	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
クルミ (9)	アメリカ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
クルミ(煎) (2)	アメリカ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
大豆 (7)	日本(北海道)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

4. 加工品に対する試験法の適応

流通実態調査を実施した際に、加工品も多く見られたことから、確立した試験法の加工品への適応を検討した。通知法では加工品はイムノアフィニティカラムを用いた精製が推奨されているが、この検討では多機能カラムの用途拡大を目的とした。煎りピーナッツ、バターピーナッツ、煎りクルミおよび煎り大豆を対象とした。各食品のクロマトグラムを図8に示し、回収率を表6に示した。煎りクルミはクルミとほぼ同様に夾雑ピークが除去されており、回収率も89.4%~102.0%と良好であったため、確立した試験法が適応できると考えられる。一方、煎りピーナッツ、バターピーナッツおよび煎り大豆はピーナッツおよび大豆に比べて夾雑ピークが除去されておらず、AFG₁および

AFB₁は測定不可であった。よって、ピーナッツおよび大豆の加工品については、さらなる試験法の検討が必要であると考えられた。

そこで、夾雑ピークの低減を目的として、煎りピーナッツを検体として試験法を比較した。多機能カラムを用いた精製では表7に示すようにカラム溶出液の採取量や最終検液中の検体濃度を変更した。このとき、誘導体化に用いたTFAやアセトニトリル/水(1:9)混液の量は目的の最終検液中の検体濃度となるように調整した。また、より夾雑物の除去が期待できる方法として、図1(B)のフローに示すように、イムノアフィニティカラム AflaStar Rを用いた精製を実施した。

得られたクロマトグラムを図9に、添加回収試験の結果を表8に示した。多機能カラムの精製では、溶出液の採取量等を調整することで、夾雑物の影響が低減される傾向が見られたが、いずれの場合も夾雑物の除去が不十分な成分があった。一方、イムノアフィニティカラムによる精製では夾雑のピークはほぼ見られず、回収率も85.7%~91.4%と良好であった。以上より、加工品のピーナッツおよび大豆に対するイムノアフィニティカラム精製の有効性が確認できたが、イムノアフィニティカラムは抽出・精製工程が煩雑であり、高価で使用期限があること等から有事対応としては課題が残る。このため、さらなる多機能カラムの用途拡大を図るため、イムノアフィニティカラムの検討と併行して引き続き工夫・検討を重ねていきたい。

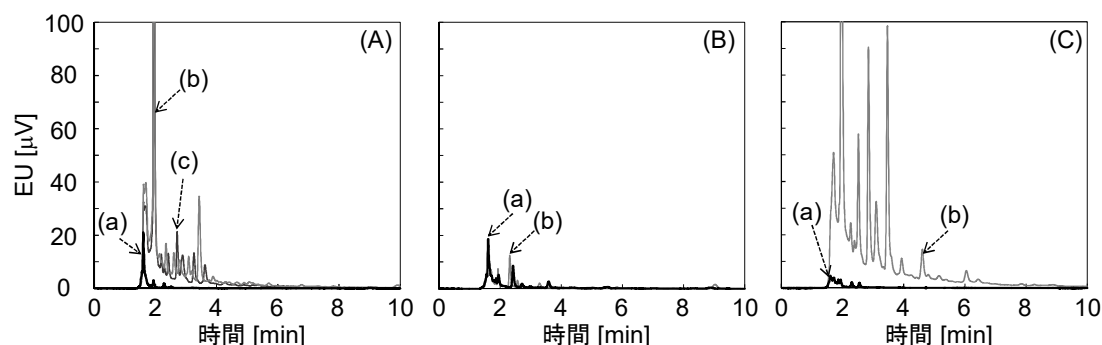


図8 加工品のクロマトグラムの比較

(A) ピーナッツ (B) クルミ (C) 大豆 (a) 生 (b) 煎り (c) バターピーナッツ

表6 加工品の回収率の比較

物質名	ピーナッツ	バター ピーナッツ	ピーナッツ (煎)	クルミ	クルミ (煎)	大豆	大豆 (煎)
	回収率[%]						
AFB ₁	99.0	不可	不可	97.1	89.4	96.1	不可
AFB ₂	102.0	94.5	98.1	92.3	96.5	99.5	98.0
AFG ₁	97.0	不可	不可	95.4	102.0	97.0	不可
AFG ₂	101.4	97.4	97.1	97.3	90.7	99.2	90.6

表7 多機能カラム精製の検討条件

条件番号	採取液量	最終検液中の検体濃度
1	初期溶出2 mL	検体0.5 g/mL相当
2	初期溶出1 mL	検体0.5 g/mL相当
3	初期溶出1 mL	検体0.2 g/mL相当

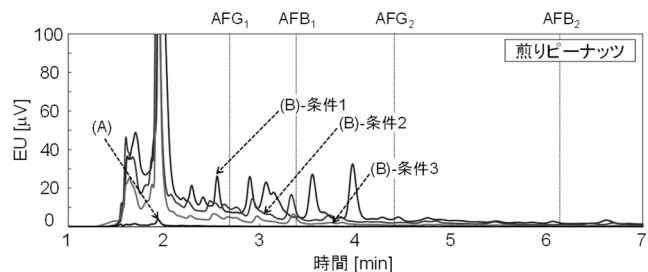


図9 各試験法のクロマトグラム

(A)イムノアフィニティカラム精製 (B)多機能カラム精製

表8 各試験法の回収率

使用カラム	条件	各AF回収率 [%]			
		AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
多機能カラム MultiSep #228	1	不可	98.5	不可	99.3
	2	不可	94.0	不可	101.9
	3	不可	87.1	不可	102.8
イムノアフィニティ カラム AflaStar R	-	85.7	86.8	85.8	91.4

まとめ

1. 多機能カラムを用いた総 AF 試験法について検討し、ピーナッツ、クルミおよび大豆を対象とした試験法を確立した。
2. 確立した試験法を用いて奈良県内に流通するピーナッツ、クルミおよび大豆について総 AF 実態調査を実施し、すべての検査食品において総 AF は検出されなかった。
3. 多機能カラムを用いた総 AF 試験法を確立したことで、緊急時の迅速な検査や簡易的なスクリーニング検査が実施可能になることが期待される。

文献

- 1) 食品安全委員会, かび毒評価書 総アフラトキシン (アフラトキシンB₁, B₂, G₁及びG₂) (2009)
- 2) 田端節子: ぶんせき 2008, 10, 551-557 (2008)
- 3) 谷口賢: Mycotoxins, 62, 127-131 (2012)
- 4) 吉成知也: Mycotoxins, 62, 121-125 (2012)
- 5) 岩屋あまね, 下堂菌栄子, 榎元清美, 他: 鹿児島県環境保健センター所報, 12, 77-82 (2011)

6) 大坪昌宏, 瀧井美樹, 小林千恵, 他: 静岡県環境衛生科学研究所報告, 55, 51-54 (2012)

7) 小阪田正和, 吉光真人, 福井直樹, 他: 大阪府立公衆衛生研究所研究報告, 54, 29-33 (2016)

超臨界流体抽出および GC-MS/MS による畜産物中残留農薬一斉分析法の検討

南浦茉奈・上床知佐奈・竹田依加・中永絵理・上眞佐美

Investigation on a Method for Simultaneous Analysis of Pesticides in Livestock Products with Supercritical Fluid Extraction and GC-MS/MS

Mana MINAMIURA・Chisana UWATOKO・Erika TAKEDA・Eri NAKAE and Masami KAMI

超臨界流体抽出 (Supercritical Fluid Extraction, 以下, SFE とする) を使用した前処理方法で, GC-MS/MS 測定対象農薬 335 化合物を対象とし, 0.01 $\mu\text{g/g}$ および 0.05 $\mu\text{g/g}$ の 2 濃度で牛, 豚および鶏の筋肉の 3 つの畜産物を試料として妥当性評価を実施した. 妥当性評価の結果, 各試料中のそれぞれ 163, 211 および 184 化合物が真度, 併行精度, 室内精度の目標値を満たしたため, 本試験法の有用性を確認することができた.

緒言

食品中の残留農薬等の基準はポジティブリスト制度の施行に伴い, 農産物のみならず畜産物についても多くの農薬に残留基準値が設定され, 多成分一斉分析法の開発が必要とされている. 厚生労働省から一斉試験法「GC/MS による農薬等の一斉試験法 (畜水産物)」¹⁾等が通知されているが, これらの試験法の中で示される前処理方法は抽出液の精製にゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) を用いるため, 有機溶媒の使用量が多く, 専用の機器の導入が必要であり, 処理操作が複雑で熟練を要する.

一方, SFE は農薬抽出時に使用する有機溶媒が少なく, 農薬を迅速に抽出することが可能うえに, 目的物質の抽出効率が高い抽出方法である. これまでに, 当センターでは SFE を用いた農産物を対象とする残留農薬の一斉分析法および妥当性評価結果について報告してきた²⁻⁵⁾. しかし, 畜産物を対象とした分析法は報告例が極めて少なく知見に乏しい^{6,7)}.

今回の検討では, SFE を用いた畜産物中の残留農薬一斉分析法の検討を行い, 「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価のためのガイドライン」⁸⁾ (以下, ガイドラインとする) に従って, 本試験法の妥当性を評価したため報告する.

方法

1. 試料

添加を行う食品は県内で流通している牛の筋肉, 豚の筋肉および鶏の筋肉の 3 種類を試料として選定した. 各試料はミキシングカッターで粉碎して均一化した後, ただちに使用しない場合はポリプロピレン製袋に入れ,

冷蔵もしくは小分け冷凍保存した. 冷凍試料は使用直前に解凍させ用いた.

2. 対象農薬

GC-MS/MS による測定は林純薬工業 (株) 製 GC/MS 用農薬混合標準溶液 7 グループ (PL2005 農薬 GC/MS Mix I, PL2005 農薬 GC/MS Mix II, PL2005 農薬 GC/MS Mix III, PL2005 農薬 GC/MS Mix IV, PL2005 農薬 GC/MS Mix V, PL2005 農薬 GC/MS Mix VI および PL2005 農薬 GC/MS Mix 7) のうち, 混合標準溶液の定量下限値 (S/N 比 ≥ 10) が 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 以下であった 335 化合物を対象とした. 感度不良およびピーク形状が悪いことが事前に明らかになったため, 妥当性評価を実施しなかった農薬は MCPB, TCMTB, アザメチホス, アミトラズ, オリザリン, カプタホール, カルベタミド, クロロタロニル, スピロキサミン I, スピロジクロフェン, ナレド, ピラゾキシフェン, フェリムゾン, プロパルギット, プロヒドロジャスモン II, メトプレン I, メトプレン II およびメトミノストロビン (E) である.

3. 試薬等

前処理に用いる有機溶媒および試薬は富士フィルム和光純薬 (株) または関東化学 (株) の残留農薬試験用試薬を用いた. GC-MS/MS による測定に用いた農薬混合標準液 7 グループは 2 $\mu\text{g/mL}$ の濃度になるようアセトンで希釈混合し, これを GC-MS/MS 用標準溶液として, 添加試料の調製および検量線の作成に適宜希釈して用いた. 珪藻土は富士フィルム和光純薬 (株) 製のセライト No. 545 を用いた. 吸水性ポリマーは三

菱化学（株）製の高吸水性ポリマー（アクアパール）を用いた。エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル（PSA）ミニカラムはSUPELCO社製 PSA（充填量 500 mg；カラムサイズ 6 mL）を、グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル（GC/PSA）積層ミニカラムは同社製 ENVI-Carb II/PSA（充填量 500 mg/500 mg；カラムサイズ 6 mL）を用いた。

4. 装置

SFE 装置は日本分光（株）製全自動残留農薬抽出システムⅢ型（10 mL×6 ベッセルタイプ）を使用した。GC-MS/MS は Agilent 社製ガスクロマトグラフ GC7890B および同社製質量分析計 7000D を使用した。ミキシングカッターは東芝（株）製 CQM-V2 を、高速ホモジナイザーは KINEMATICA 製 Polytron PT 10-35 GT を使用した。

5. SFE 条件

抽出容器：EV-2 型（10 mL，内径 10 mm×127 mm），抽出圧：15 MPa，抽出温度：40℃，抽出時間：30 min，トラップカラム：ODS（装置付属品，4.6 mm i.d.×50 mm），トラップカラムからの溶出溶媒：アセトン（2 mL/min，溶出時間 1 min）

6. GC-MS/MS 測定条件

1) GC 条件

カラム：Agilent 社製 VF-5ms（内径 0.25 mm，長さ 30 m，膜厚 0.25 μm），カラム温度：70℃（2 min）→25℃/min→150℃→3℃/min→200℃（0 min）→8℃/min→310℃（5 min），注入口温度：250℃，トランスファーライン温度：315℃，注入量：2 μL（スプリットレス），キャリアガス：He

2) MS 条件

MS イオン源温度：280℃，四重極温度：150℃，イオン化法：EI，イオン化電圧：70 eV，各農薬の測定イオン（*m/z*）：表に示した。

7. 試験溶液の調製法

試験溶液の調製法を図に示した。50 mL ポリプロピレン製遠沈管に採取した試料 5.00 g に水 20.0 g を加え，高速ホモジナイザーで約 1 分間ホモジナイズした。混和物 10.0 g を乳鉢に分取し，珪藻土 2.00 g，吸水性ポリマー 2.00 g とともに乳棒を用いて混和した。抽出管付属フィルターの目詰まり防止のため適量の脱脂綿を敷き詰めた後，混和した試料混合物 7.00 g（試料 1.00

g 相当）を抽出管に充填した。超臨界状態を保つため管内の空隙が埋まるように脱脂綿を適量充填後，SFE 装置内の恒温槽に接続した。抽出管内部の温度が 40℃となるよう，接続後 30 分間静置した後，上述の条件で抽出操作を行い，得られた抽出物を装置付属の ODS カラムに捕集された成分を溶出させた。溶出液を 40℃以下の窒素気流下で濃縮し，溶媒を除去後，アセトン/*n*-ヘキサン（1:1）混液に溶解したものを GC-MS/MS の試験溶液（試料 0.5 g 相当/mL）とした。

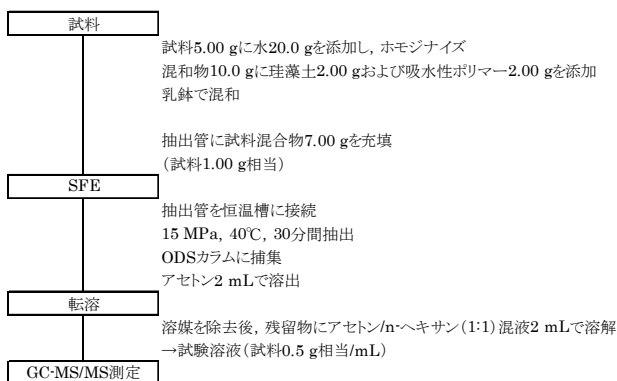


図 試験溶液調製法の概要

8. 妥当性評価

添加濃度は 0.01 μg/g および各農薬の基準値に近い一定の濃度として 0.05 μg/g を採用し，試料に対して各農薬標準液を添加した。添加後，30 分経過してから 7. 試験溶液の調製法に従い抽出操作を開始した。添加回収試験は，分析者 1 名が併行数 2 で 5 日間の枝分かれ試験で実施した。得られた結果から，ガイドラインで定義されている選択性，真度，併行精度および室内精度を算出した。各化合物の評価結果の分類は既報²⁾と同様に，各試料・化合物ごとに得られた真度，精度に応じて A（真度 70～120%，精度および選択性とも目標値を満たす），B（精度，選択性とも目標値を満たすが真度が A の範囲以外で 50～150%），C（精度，選択性とも目標値を満たすが，真度が 30%～50%もしくは 150%～），D（真度 30%未満もしくは，精度，選択性のいずれかの目標値を満たさない）の 4 つのグループに分類した。

検量線は 2.5，5，15，25 および 37.5 ng/mL になるように，標準溶液をブランク試料から操作して得られた試験溶液で希釈し，マトリックス添加標準溶液を調製し，各装置に注入して，ピーク面積法で作成した。マトリックス検量線から絶対検量線法により濃度を求めた。

結果および考察

1. 前処理方法の検討

1) 農薬抽出工程の水の添加量の検討

農産物よりも水分の少ない試料に対して、水を加えて十分にホモジナイズすることで、試料の流動性を高め、操作性および抽出効率を改善させる手法が報告されている^{5, 9, 10}。今回使用した試料中で脂質含有量が17.5%¹¹と最も多い牛の筋肉を代表試料として使用し、農薬抽出工程時の水の添加量の検討を行った。試料5.00 g に対して水の添加量を5.00 g, 10.0 g および20.0 g に変化させ、抽出液の溶媒除去操作後の残渣の重量、一律基準相当濃度の添加回収試験 (n=1) による各化合物の真度を比較した。水の添加量を増加させるほど、抽出液の溶媒除去後の残渣の重量が少なくなり、水の添加量が5.00 g に対して20.0 g の時には残渣の重量は半減した。また、添加回収試験の結果から、70%以上120%未満の真度を示す化合物が水の添加量5.00 g の場合は50%程度であったことに対し、水の添加量

20.0 g の場合は60%程度に増加した。以上の結果より、水の添加量を20.0 g とした。

2) 精製用ミニカラムの検討

穀類や豆類を対象とした既報³⁾では、SFE 抽出後、色素・脂質除去を目的としてPSA ミニカラムおよびGC/PSA ミニカラム等の追加精製を検討し、PSA ミニカラムの2回精製を実施している。畜産物中で脂質含有量の多い牛の筋肉を代表試料として使用し、精製用ミニカラムの検討を行った。SFE 抽出後の追加精製にPSA ミニカラムおよびGC/PSA ミニカラムを使用し、一律基準相当濃度の添加回収試験 (n=1) による各化合物の真度を比較したところ、回収率の改善は見られなかった。操作性、連続分析で測定装置に特に問題が生じなかったことおよびコストを考慮して、ミニカラムによる追加精製は行わないこととした。

2. 妥当性評価

妥当性評価の結果、335化合物中牛の筋肉では163

表 GC-MS/MS 測定条件および対象化合物の妥当性評価結果

化合物	保持時間 (分)	ブリーカー サイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	妥当性評価結果				化合物	保持時間 (分)	ブリーカー サイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	妥当性評価結果			
				添加濃度(μg/g)								添加濃度(μg/g)			
				0.01 and 0.05								0.01 and 0.05			
牛の筋肉 豚の筋肉 鶏の筋肉 全試料				牛の筋肉 豚の筋肉 鶏の筋肉 全試料											
2,6-ジクロロベンゼンザミド	12.4	173	109	D	D	C	D	インドキサカルブ	34.7	203	134	D	A	A	D
BHC (α)	13.1	217	181	B	B	B	B	ウニコナゾール p	25.0	234	165	A	A	A	A
BHC (β)	14.3	217	181	A	A	A	A	エスプロカルブ	19.5	222	91	B	A	A	B
BHC (γ)	14.6	217	181	B	A	B	B	エタルフルラリン	11.8	276	202	B	B	B	B
BHC (δ)	16.1	217	181	A	A	A	A	エチオン	26.4	231	129	B	A	B	B
DCIP	4.7	121	45	D	D	D	D	エチクロゼート	22.6	238	165	A	A	A	A
EPN	29.1	169	77	B	A	A	B	エディフェンホス	27.4	310	109	A	A	A	A
EPTC	7.3	128	43	D	C	D	D	エトキサゾール	29.3	300	270	B	B	B	B
MCPBエチル	16.8	115	87	B	B	B	B	エトキサゾール代謝物	29.6	246	84	D	D	D	D
XMC	10.3	122	107	A	A	A	A	エトフェンブロックス	33.2	163	107	D	B	B	D
アクリナトリン	30.7	289	93	B	B	C	C	エトフメセート	19.3	207	161	D	D	D	D
アザコナゾール	25.4	217	173	A	A	A	A	エトプロホス	11.6	158	97	B	A	B	B
アジンホスエチル	30.9	160	77	A	A	A	A	エトベンザニド	32.2	179	149	A	A	A	A
アジンホスメチル	30.1	160	77	A	A	A	A	エトリジアゾール	8.5	211	183	D	C	C	D
アセタミプリド	28.9	152	116	D	D	D	D	エトリムホス	15.9	292	181	A	A	B	B
アセトクロール	17.4	223	132	B	B	B	B	エボキシコナゾール	28.5	192	138	A	A	A	A
アノキシストロビン	35.1	344	329	D	A	A	D	エンドスルファン (α)	23.8	205	170	B	A	B	B
アトラジン	14.3	215	58	A	A	A	A	エンドスルファン (β)	26.2	205	170	B	A	A	B
アニロホス	29.5	226	157	A	A	A	A	エンドスルファンサルフェート	27.5	272	237	A	A	A	A
アメリリン	18.4	227	185	A	A	A	A	オキサジアゾン	25.0	175	112	B	A	A	B
アラクロール	17.8	188	160	A	B	B	B	オキサジキシル	26.4	163	132	A	A	A	A
アリドクロール	6.6	132	56	D	D	D	D	オキサベトリニル	16.5	73	45	A	A	A	A
アレスリン I~IV	22.5	123	81	D	D	D	D	オキシフルオルフェン	25.3	300	223	B	B	B	B
イサゾホス	15.7	257	162	B	B	B	B	オキシボコナゾール	31.9	294	197	A	A	A	A
イソカルボホス	20.7	289	136	A	A	A	A	オキシボコナゾール代謝物 ¹ (ホルミル体)	17.5	114	60	A	A	A	A
イソキサジフェンエチル	27.2	294	204	B	B	D	D	オムトエート	10.8	156	110	D	D	D	D
イソキサチオン	25.7	177	130	A	A	A	A	オルトフェニルフェノール	9.6	170	169	B	B	B	B
イソフェンホス	22.3	213	121	A	A	A	A	カズサホス	12.7	159	97	B	B	B	B
イソフェンホスオキソン	20.8	229	201	A	A	D	D	カフエンストール	32.2	188	82	A	A	A	A
イソプロカルブ	9.8	136	121	B	A	A	B	カルフェントラゾンエチル	27.3	340	312	B	B	C	C
イソプロチオラン	24.7	290	118	A	A	A	A	カルボキシ	25.3	235	143	B	A	A	B
イブロジオン	28.9	314	245	A	A	A	A	カルボフェノチオン	27.3	342	157	B	B	B	B
イブロジオン代謝物	29.7	329	142	D	D	D	D	カルボフラン	14.0	164	103	A	A	A	A
イブロベンホス	16.3	204	91	A	A	A	A	キシリルカルブ	10.9	122	107	A	A	A	A
イマザタベンズメチルエステル L II	25.6	245	144	D	A	A	D	キナルホス	22.7	146	118	A	A	A	A
イメベンコナゾール	36.0	253	82	D	A	A	D	キノキシフェン	27.5	307	237	B	B	B	B
イメベンコナゾール脱ベンジル体	25.4	235	166	A	A	A	A	キノクラミン	19.7	207	172	A	A	A	A
インダノファン	29.5	159	103	A	B	D	D	キノモチオネート	23.4	206	148	D	D	D	D

表 (続き)

化合物	保持時間 (分)	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	妥当性評価結果				化合物	保持時間 (分)	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	妥当性評価結果			
				添加濃度(μg/g) 0.01 and 0.05								添加濃度(μg/g) 0.01 and 0.05			
				牛の筋肉	豚の筋肉	鶏の筋肉	全試料					牛の筋肉	豚の筋肉	鶏の筋肉	全試料
キャブタン	22.7	149	70	D	D	D	D	ジメチルピビンホス (Z)	20.1	295	109	A	A	A	A
キントゼン	14.3	249	214	B	B	B	B	ジメテナミド	17.1	230	154	A	A	A	A
クリミジン	9.4	171	142	B	B	B	B	ジメエート	13.7	125	47	A	A	A	A
クレンキシムメチル	25.4	206	116	A	A	A	A	ジメトモルフ (E)	35.6	301	165	D	A	A	D
クロノリネート	22.3	259	188	B	D	D	D	ジメトモルフ (Z)	35.3	301	165	D	A	A	D
クロフェンテジン(分解物)	5.7	137	102	B	B	D	D	シメトリン	18.2	213	170	A	A	A	A
クロマゾン	14.3	125	89	A	A	A	A	ジメビベレート	22.8	145	112	B	A	A	B
クロメキシニル	28.8	313	266	B	A	A	B	シラフルオフェン	33.3	179	151	D	B	C	D
クロメブロップ	29.7	288	169	A	A	A	A	シンメチリン	18.3	216	105	A	A	A	A
クロリダゾン	27.7	221	220	D	D	D	D	スクエップ	14.3	187	124	A	A	A	A
クロロエトキシホス	11.2	153	97	B	B	B	B	スピロキサミン II	19.1	100	58	D	D	D	D
クロルタールジメチル	20.2	301	223	A	A	A	A	スルプロホス	27.0	322	156	B	B	B	B
クロルチオホス I, II	26.3	325	269	B	B	B	B	スルホテップ	12.4	322	146	B	B	B	B
クロルニトロフェン	27.2	317	287	B	A	B	B	ゾキサミド	28.5	258	187	B	B	B	B
クロルピリホス	20.0	314	258	B	A	B	B	ゾキサミド(分解物)	23.0	242	214	D	D	D	D
クロルピリホスメチル	17.4	286	93	A	A	A	A	ターバシル	15.8	161	88	A	A	A	A
クロルフェナピル	25.6	247	227	B	A	A	B	ダイアジノン	15.1	304	179	B	A	B	B
クロルフェンゾン	24.5	302	175	A	A	A	A	ダイアレート I, II	13.1	234	150	B	B	B	B
クロルフェンピビンホス (a) (E)	21.9	267	159	A	A	A	A	チアベンダゾール	22.8	201	174	D	D	D	D
クロルフェンピビンホス (b) (Z)	22.5	267	159	A	A	A	A	チアメトキサム	21.6	247	212	D	D	D	D
クロルブファミ	14.3	223	171	A	A	A	A	チオシクラム	9.4	135	71	D	D	D	D
クロルプロビレート	26.1	251	139	A	A	A	A	チオベンカルブ	20.0	257	100	D	D	D	D
クロルプロファミ	12.1	213	127	A	A	A	A	チオメトン	13.4	88	60	B	B	B	B
クロルベンシド	23.3	268	125	B	B	B	B	チフルザミド	25.1	194	166	A	A	A	A
クロルメホス	8.3	234	121	C	C	C	C	テクナゼン	10.9	261	203	B	B	B	B
クロロネブ	9.3	208	193	B	C	C	C	デスメディファミ	13.7	181	109	B	A	A	B
シアナジン	20.7	225	189	A	A	D	D	テトラクロルピビンホス	23.7	331	109	A	A	A	A
シアノフェンホス	27.4	303	141	A	A	A	A	テトラコナゾール	20.8	336	218	A	A	A	A
シアノホス	14.9	243	109	A	A	B	B	テトラジホン	29.8	354	159	B	A	A	B
ジアリホス	31.0	208	89	A	A	A	A	テトラメトリン I, II	29.2	164	77	A	A	A	A
ジエトフェンカルブ	20.3	267	225	A	A	A	A	テニルクロール	27.9	288	141	A	A	A	A
ジオキサチオン(分解物)	14.6	270	197	B	B	B	B	テブコナゾール	28.1	250	125	A	A	A	A
ジオキサベンゾホス	12.5	216	137	B	B	B	B	テブピリミホス	16.2	261	137	B	B	B	B
ジクロシメット I, II	23.1	277	221	A	A	A	A	テブフェンピラド	29.5	276	171	A	A	A	A
ジクロトホス	12.2	127	109	D	D	D	D	テフルトリン	15.8	177	127	B	B	C	C
ジクロフェンチオン	17.1	279	223	B	B	B	B	デメトン-S-メチル	11.4	142	79	B	A	A	B
ジクロプロトラゾール	25.3	270	159	A	A	A	A	デルタメトリン	34.8	255	174	D	B	B	D
ジクロフルアニド	19.4	226	123	D	D	D	D	テルブカルブ	17.3	220	205	A	A	A	A
ジクロフルアニド代謝物	12.2	200	45	B	B	D	D	テルブトリン	19.2	241	185	A	A	A	A
ジクロベニル	7.3	171	100	D	C	C	D	テルブホス	14.8	231	129	B	B	B	B
ジクロホップメチル	28.1	253	162	B	B	C	C	トリアジメノール I, II	23.0	168	70	D	D	D	D
ジクロラン	13.7	206	176	A	A	A	A	トリアジメホス	20.6	208	181	A	A	A	A
ジクロルボス	6.2	185	93	D	D	D	D	トリアソホス	27.0	257	162	A	A	A	A
ジスルホトン	15.6	186	97	B	B	B	B	トリアレート	16.0	268	184	B	B	B	B
ジスルホトンスルホン	23.8	213	97	A	A	A	A	トリクラミド	23.7	148	121	A	A	A	A
ジタリムホス	24.1	243	130	D	D	D	D	トリシクラゾール	24.7	189	162	D	C	C	D
ジチオビル	18.5	354	306	B	B	B	B	トリブホス	25.1	202	113	B	B	B	B
ジニコナゾール	26.3	268	232	A	A	A	A	トリフルラリン	12.2	306	264	B	B	B	B
シニドニエチル	36.1	330	302	D	A	B	D	トリフロキシストロビン	27.5	186	145	A	A	A	A
シハロトリン I, II	30.3	197	161	B	B	C	C	トリルフルアニド	22.3	238	137	D	D	D	D
シハロホップブチル	30.3	256	120	A	B	C	C	トリルフルアニド代謝物	14.6	214	45	D	B	D	D
ジフェナミド	21.3	167	165	A	A	A	A	トルクロホスメチル	17.8	265	250	B	A	A	B
ジフェニルアミン	11.6	168	167	B	B	B	B	トルフェンピラド	35.4	383	171	D	A	A	D
ジフェノコナゾール I, II	34.5	323	265	D	A	A	D	ナフタレンアセタミド	19.0	185	142	D	D	B	D
シフルトリン I~IV	32.3	163	127	B	B	C	C	ナプロバミド	24.3	271	72	A	A	A	A
シフルフェナミド	25.7	223	203	A	A	A	A	ニトラリン	28.4	316	274	A	A	A	A
ジフルフェニカン	28.2	266	218	A	A	A	A	ニトロタールイソプロピル	21.0	236	194	B	A	A	B
シプロコナゾール	25.7	222	125	A	A	A	A	ニトロフェン	25.8	283	253	A	A	A	A
シプロジニル	22.0	225	224	A	A	A	A	ネライストキシシ	6.6	149	71	D	D	D	D
シバルメトリン I~IV	33.0	163	127	B	B	C	C	ノルフルラジン	27.4	303	145	A	A	A	A
シマジ	14.1	201	173	A	A	A	A	バクプロトラゾール	23.7	236	125	A	A	A	A
シメコナゾール	17.8	195	75	A	A	A	A	パラチオン	20.4	291	109	A	A	A	A
ジメタメトリン	22.4	212	94	A	A	A	A	パラチオンメチル	17.8	263	109	A	A	B	B
ジメチピ	14.4	124	76	A	A	A	A	ハルフェンブロックス	32.8	265	117	B	B	C	C
ジメチルピビンホス (E)	19.4	295	109	A	A	A	A	ビオレスメトリン	28.4	171	128	B	B	C	C

表 (続き)

化合物	保持時間(分)	プリカーサイオン(m/z)	プロダクトイオン(m/z)	妥当性評価結果				化合物	保持時間(分)	プリカーサイオン(m/z)	プロダクトイオン(m/z)	妥当性評価結果			
				添加濃度(µg/g)								添加濃度(µg/g)			
				0.01 and 0.05								0.01 and 0.05			
				牛の筋肉	豚の筋肉	鶏の筋肉	全試料					牛の筋肉	豚の筋肉	鶏の筋肉	全試料
ピコリナフェン	29.2	376	238	B	A	B	B	フルトリアホール	24.2	123	95	D	D	D	D
ピテルタノール I, II	31.5	170	115	A	A	A	A	フルバリネート-tau-I, II	34.0	250	55	D	B	C	D
ピフェナゼート	29.3	300	258	D	B	B	D	フルフェンビルエチル	26.2	408	345	B	B	C	C
ピフェニル	7.8	154	153	D	C	D	D	フルミオキサジン	33.9	287	259	D	A	B	D
ピフェノックス	29.6	341	310	B	A	A	B	フルミクロラックベンチル	35.0	423	318	D	B	C	D
ピフェントリン	29.0	181	165	B	B	C	C	フルリドン	33.5	329	328	D	A	A	D
ピペロニルプトキシド	28.3	176	103	B	A	A	B	プレチラクロール	24.7	262	202	B	A	A	B
ピペロホス	29.1	320	122	A	A	A	A	プロシミドン	22.8	283	96	A	A	A	A
ピラクロストロビン	34.1	164	132	D	A	A	D	プロチオホス	24.5	267	239	B	B	B	B
ピラクロホス	31.2	360	97	A	A	A	A	プロバクロール	11.1	196	120	D	D	D	D
ピラゾホス	30.7	221	193	A	A	A	A	プロバジン	14.5	214	172	A	A	A	A
ピラフルフェンエチル	27.7	412	349	B	B	C	C	プロバニル	17.4	161	99	A	A	A	A
ピリダフェンチオン	28.8	340	199	A	A	A	A	プロバホス	23.6	304	220	A	A	A	A
ピリダベン	31.8	147	117	B	B	B	B	プロピコナゾール I, II	27.5	259	69	A	A	A	A
ピリフェノックス (E)	23.6	262	91	A	A	A	A	プロピザミド	15.0	173	145	A	A	A	A
ピリフェノックス (Z)	22.4	262	91	A	A	A	A	プロピドロジャクソン I	15.7	153	83	D	A	B	D
ピリブチカルブ	28.6	165	108	B	A	B	B	プロフェノホス	24.8	339	269	A	A	A	A
ピリプロキシフェン	30.3	136	96	B	A	A	B	プロボキスル	11.1	110	64	A	A	A	A
ピリミジフェン	33.7	184	169	D	A	A	D	プロマシル	20.2	205	188	A	A	D	D
ピリミノバックメチル (E)	27.6	302	256	A	A	A	A	プロムコナゾール I, II	29.3	293	173	A	A	A	A
ピリミノバックメチル (Z)	26.2	302	256	A	A	A	A	プロメトリン	18.5	241	184	A	A	A	A
ピリミホスメチル	19.0	290	125	B	A	B	B	プロモブチド	17.4	296	120	A	A	A	A
ピリメタニル	15.4	199	198	A	A	A	A	プロモプロピレート	29.1	341	183	B	A	A	B
ピロキロン	15.1	173	130	A	A	A	A	プロモホス	21.1	331	316	B	A	A	B
ピンクロソリン	17.7	285	212	A	A	B	B	プロモホスエチル	23.3	359	303	B	B	B	B
ファミキサドン	35.4	329	193	D	A	A	D	ヘキサコナゾール	24.5	214	172	A	A	A	A
フィプロニル	22.2	367	213	A	A	A	A	ヘキサジン	27.9	171	71	A	A	A	A
フェナミホス	24.4	303	195	D	D	D	D	ベナラキシル	27.2	266	148	A	A	A	A
フェナリモル	30.8	219	107	A	A	A	A	ベノキサコール	16.5	259	120	B	B	B	B
フェニトロチオン	19.1	277	260	A	A	B	B	ベルタン	25.9	223	167	B	B	B	B
フェノキサニル	25.8	293	155	A	A	A	A	ペルメトリン (cis,trans)	31.8	163	127	B	B	C	C
フェノキサプロップエチル	31.2	361	288	B	B	C	C	ペンコナゾール	22.2	248	157	A	A	A	A
フェノキシカルブ	29.2	255	186	D	A	D	D	ペンディメタリン	21.8	252	162	B	A	B	B
フェノチオール	16.1	155	125	B	B	B	B	ペントキサジン	30.0	285	70	A	A	A	A
フェノチオカルブ	23.9	160	72	A	A	A	A	ペンフルラン	12.3	292	264	B	B	B	B
フェノトリン I, II	29.9	183	153	D	D	D	D	ペンフレセート	17.1	256	163	A	A	A	A
フェンアミドン	29.4	238	237	A	A	A	A	ホサロン	30.0	367	182	A	C	A	C
フェンクロロホス	18.3	285	270	B	A	B	B	ホスチアゼート I, II	21.3	195	103	A	A	A	A
フェンスルホチオン	26.3	293	97	A	A	A	A	ホスファミドン I	15.2	264	127	A	A	A	A
フェンチオン	20.3	278	109	A	A	A	A	ホスファミドン II	17.0	264	127	A	A	A	A
フェントエート	22.7	274	121	A	A	B	B	ホスメット	29.0	160	77	A	A	A	A
フェンバレレート I, II	34.0	167	125	D	B	C	D	ホノホス	15.0	246	109	B	B	B	B
フェンプロナゾール	32.3	198	129	A	A	A	A	ホルベット	23.0	260	130	D	D	D	D
フェンプロバトリン	29.3	265	210	B	B	B	B	ホルモチオン	16.7	170	93	D	D	D	D
フェンプロビモルフ	20.3	128	70	D	D	D	D	ホレート	12.9	260	75	B	B	B	B
フェンメディファム	12.0	167	135	C	B	B	C	マラチオン	19.7	173	99	B	B	B	B
フサライド	20.9	243	215	A	A	A	A	ミクロプタニル	25.2	179	125	A	A	A	A
ブタクロール	23.8	237	160	B	A	B	B	メカルバム	22.6	329	131	D	A	A	D
ブタフェナシル	32.0	331	180	A	A	A	A	メタクリホス	9.1	208	180	B	C	C	C
ブタミホス	24.1	286	202	A	A	A	A	メタラキシル	18.2	234	146	A	A	A	A
ブチレート	8.1	156	57	D	C	C	D	メチダチオン	23.3	145	85	A	A	A	A
ブピリメート	25.4	273	193	A	A	A	A	メキシクロール	29.3	227	169	B	A	B	B
ブプロフェジン	25.2	172	57	B	A	D	D	メトミノストロビン (Z)	25.4	196	77	A	A	A	A
ブラムプロップメチル	25.1	276	105	A	A	A	A	メトラクロール	19.8	238	162	A	A	A	A
フラメトビル	29.7	291	157	A	A	A	A	メトリブジン	17.6	198	82	A	A	A	A
フラメトビル代謝物	30.5	296	278	A	A	A	A	メビンホス	8.1	192	127	D	B	C	D
フリラゾール	13.9	262	220	A	A	A	A	メフェナセット	30.4	192	136	A	A	A	A
フルアクリリム	26.8	320	183	A	A	A	A	メフェンビルジエチル	28.6	253	189	A	A	A	A
フルキシコナゾール	31.8	340	108	A	A	A	A	メプロニル	27.0	269	119	A	A	A	A
フルジオキソニル	24.8	248	127	A	A	A	A	モノクロトホス	12.6	192	127	D	D	D	D
フルシトリネート I, II	32.9	199	107	B	B	C	C	モリネート	10.0	187	126	B	C	C	C
フルシラゾール	25.3	233	165	A	A	A	A	レスメトリン I, II	28.3	171	143	B	B	B	B
フルシラゾール代謝物	12.2	235	95	A	A	A	A	レナシル	27.7	153	136	A	A	A	A
フルチアセツトメチル	36.4	403	56	D	C	D	D	レプトホス	30.0	377	362	B	B	B	B
フルトラニル	24.5	281	173	A	A	A	A								

化合物 (49%), 豚の筋肉では 211 化合物 (63%), 鶏の筋肉では 184 化合物 (55%) がガイドラインの目標値に適合した (表). 全 3 種類の試料では 335 化合物中 150 化合物 (45%) がガイドラインの目標値に適合した. また, いずれの試料でもグループ D に分類された化合物は 76 化合物であった (23%). 3 試料中牛の筋肉でガイドラインの基準に適合した化合物が最も少なかったため, 脂質含有量が最も多く, 水分含有量が最も少ないことが原因として考えられたが, 詳細な原因の解明は今後の課題とすることとした. 既報^{2,5)}と同様に, グループ D に分類された農薬の真度が低い原因について, 農薬の極性の指標となるオクタノール/水分分配係数 $\log P_{ow}$ を調査したが, ジクロトホスが -0.49 に対し, チオベンカルブが 4.23 である等, 一定の範囲に収まることはなく, 傾向はみられなかった. また, 農産物である野菜・果実を対象とした既報²⁾において全 5 種類の試料で目標値を達成しグループ A に分類された化合物のなかで, 今回, 畜産物を対象とした全 3 種類の試料すべてで目標値を達成することができなかった化合物は 27 化合物であった. 高極性 ($\log P_{ow} < 3$) の農薬は脂溶性が低く, 中極性から低極性の農薬は脂肪組織に蓄積する可能性が高いため^{6,7)}, $\log P_{ow}$ を調査したところ, カズサホスやカルボフェノチオン等, $\log P_{ow}$ が 3~5 程度の値を示す化合物が多いことが確認できた. これより, 野菜・果実では抽出効率の高かった化合物が畜産物の脂肪組織に残留することで抽出効率が低くなったことが考えられた. 本試験法では, 農産物を対象とした既報を参考に SFE 条件の設定を行ったが, 今後, 妥当性評価に適合する化合物の拡充を図るためには, 畜産物に含まれる夾雑成分の特性を考慮した SFE 条件の再検討等を行うことが必要であると考えられる.

今回, 専用の機器を導入することなく, 当センター所有の SFE 装置を使用することで, 妥当性評価に適合した GC-MS/MS 測定対象農薬について畜産物中の残留農薬を測定することが可能となった. 本試験法は有機溶媒やガラス器具の使用量が少なく, 操作が簡便であるため, 簡便で迅速な試験法として有用であると考えられる. 今後, 実際に農薬が残留する畜産物からの抽出効率の確認や, 鶏卵や水産物等の今回検討した試料と成分の異なる畜水産物への応用等についてさらなる検討が可能である.

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品に残留する農薬, 飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」, 食安発第 1129002 号, (平成 17 年 11 月 29 日) (平成 18 年 10 月 3 日一部改正, 食安発第 1003001 号)
- 2) 浦西克維, 山下浩一, 岡山明子, 他: 食品衛生学雑誌, 53, 63-74 (2012)
- 3) 浦西克維, 山下浩一, 岡山明子, 他: 食品衛生学雑誌, 53, 278-290 (2012)
- 4) 米田正樹, 西山隆之, 南浦茉奈, 他: 日本食品化学学会誌, 27, 149-155 (2020)
- 5) 米田正樹, 上床知佐奈, 南浦茉奈, 他: 日本食品化学学会誌, 28, 82-89 (2021)
- 6) Rene K. Juhler: *The Analyst*, 123, 1551-1556 (1998)
- 7) Walter Fiddler, John W. Pensabene, Robert A. Gates, et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 47, 206-211 (1999)
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」, 食安発第 1115001 号, (平成 19 年 11 月 15 日) (平成 22 年 12 月 24 日一部改正, 食安発 1224 第 1 号)
- 9) 福井直樹, 高取聡, 北川陽子, 他: 食品衛生学雑誌, 54, 426-433 (2013)
- 10) 笹本剛生, 小林麻紀, 酒井奈穂子, 他: 食品衛生学雑誌, 56, 19-30 (2015)
- 11) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会「日本食品標準成分表 2020 年版 (八訂)」, 全国官報販売組合 (2020)

