報 文

分散固相抽出および多機能カラムを用いた GC-MS/MS による
畜産物中の残留農薬一斉分析法

(平成 23 年 8 月 19 日受理)

近藤 貴英^{1,*} 蕪木 康郎¹ 柴田 雅久¹ 黒川千恵子¹
井上 豊¹ 山本 善彦² 宮崎 元伸¹New Clean-up Method with Dispersive Solid-Phase Extraction for Simultaneous
Determination of Pesticide Residues in Livestock Products by GC-MS/MSTakahide KONDO^{1,*}, Yasuo KABURAGI¹, Masahisa SHIBATA¹, Chieko KUROKAWA¹,
Yutaka INOUE¹, Yoshihiko YAMAMOTO² and Motonobu MIYAZAKI¹¹ Division of Life Science, Saitama City Institute of Health Science and Research:
7-5-12 Suzuya, Chuo-ku, Saitama-shi, Saitama 338-0013, Japan;² National Health Organization Sendai Medical Center:
2-8-8 Miyagino, Miyagino-ku, Sendai-shi, Miyagi 983-0045, Japan;

* Corresponding author

A simple clean-up method was developed for the simultaneous determination of pesticide residues in livestock products by GC-MS/MS. The pesticide residues were extracted with acetonitrile-ethanol (1:1), and matrix components such as adipose were effectively eliminated by a combination of refrigerated centrifugation, dispersive solid-phase extraction, and multifunctional column chromatography. In this method, samples are treated quickly and easily without the need for gel-permeation chromatography. Among 131 pesticides tested, 115 showed recovery within the range from 70 to 120%, with relative standard deviations of less than 15%. The quantification limits for the 115 pesticides in livestock products were 0.001 to 0.01 µg/g.

(Received August 19, 2011)

Key words: 畜産物 livestock products; 残留農薬 pesticide residues; 一斉分析 simultaneous determination; 分散固相抽出 dispersive solid-phase extraction; 多機能カラム multifunctional column; 冷却遠心分離 refrigerated centrifugation; ガスクロマトグラフィー・タンデム質量分析法 gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS)

緒 言

近年、食料自給率の向上とともに畜産経営の安定のため、自給飼料生産の重要性が注目されており、飼料用米、稲ワラなどの利用拡大が進められている。飼料作物の安定生産には、農産物の生産と同様、病虫害や雑草の防除を目的とした殺虫剤や除草剤など、農薬の使用が不可欠である。しかし、飼料の原料として使用した古畳から成分規格に違反した濃度の塩素系農薬が検出される事例も起きており、これらの飼料を摂取した家畜および畜産物の安全性を確保することが課題となっている。

食品中の残留農薬等の基準については、平成 18 年 5 月よりポジティブリスト制が導入され、畜産物にも基準値が設定された農薬等の数が大幅に増加した。これにより、畜水産物の残留農薬試験法として、厚生労働省から一斉試験法（通知法〔畜水産物〕）^{*1}が通知されている。これらの試験法では、試験溶液の調製過程において、脂質の除去にゲル浸透クロマトグラフィー（Gel Permeation Chromatography; GPC）を用いている。しかし、GPC による精製は処理操作が煩雑であるうえに、処理時間を要する（約 50 min/検体）。さらに、溶媒の使用量が多く（300 mL/

* 連絡先 seikatsu-kagaku@city.saitama.lg.jp

¹ さいたま市健康科学研究センター 生活科学課: 〒338-0013
さいたま市中央区鈴谷 7-5-12² 独立行政法人国立病院機構仙台医療センター: 〒983-0045
仙台市宮城野区宮城野 2-8-8^{*1} 厚生労働省医薬品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（一部改正）”平成 18 年 10 月 3 日、食安発第 1003001 号「GC/MS による農薬等の一斉分析法（畜水産物）」「LC/MS による農薬等の一斉分析法（畜水産物）」

h), 分取カラムの脂肪負荷量にも限度がある (0.5 g/回)。

そこで本研究では, ガスクロマトグラフ-タンデム質量分析法 (GC-MS/MS) による畜産物中の残留農薬一斉分析において, GPC を用いない試験溶液調製法について検討した。

実験方法

1. 試料および試薬

試料: ウシの筋肉, 肝臓, 腎臓, 脂肪およびブタとニワトリの筋肉を用いた。

農薬標準品: 通知法〔畜水産物〕に示されている農薬を中心として, GC-MS/MS で分析可能な殺虫剤 73 農薬, 殺菌剤 31 農薬, 除草剤 22 農薬, 寄生虫駆除剤 5 農薬, 合計 131 農薬を用いた (Table 1)。標準品は, アルドリッ, デイルドリッ, エンドリン (GLサイエンス(株)製), *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT (和光純薬工業(株)製), 農薬混合標準液 32 および農薬混合標準液 49 (関東化学(株)製) を用いた。

内部標準品: フルオランテン- d_{10} 標準品 (和光純薬工業(株)製) を用いた。

内部標準含有アセトン-ヘキサン (1:1) 混液: フルオランテン- d_{10} が 1.0 $\mu\text{g/mL}$ になるようアセトン-ヘキサン (1:1) 混液で調製した。

GC-MS/MS 用混合標準溶液: Table 1 に示した農薬をグループ A および B に分けて混合し, 各標準品が 1.0 $\mu\text{g/mL}$ になるよう内部標準含有アセトン-ヘキサン (1:1) 混液で調製した。

固相充填剤: PSA/C18 SPE Clean Up Tube 1 (スペルコ社製, PSA および C18 各 150 mg 充填) を用いた。

多機能カラム: Multisep PR (Romer Labs 社製) を用いた。

フィルター: GD/X シリンジフィルター (ワットマン社製, PVDF, 0.45 μm) を用いた。

酵母エキス抽出液: Bacto™ Yeast Extract (Becton Dickinson 社製) 20 g に沸騰水 50 mL を加えて溶解した。放冷後, これに酢酸エチル 150 mL を加えてホモジナイズし, 静置した。酢酸エチル層を分取して無水硫酸ナトリウムで脱水し, 石英ウールを用いて無水硫酸ナトリウムをろ別した後, 45℃ 以下で溶媒を減圧乾固した。残留物をアセトン-ヘキサン (1:1) 混液で溶解し, メスシリンダーを用いて 240 mL とした。

内部標準含有酵母エキス抽出液: フルオランテン- d_{10} が 1.0 $\mu\text{g/mL}$ になるよう酵母エキス抽出液で調製した。

その他の試薬: すべて残留農薬試験用を用いた。

2. 装置

高速冷却遠心機は, ハイブリッド高速冷却遠心機 6200 (久保田製作所(株)製) を用いた。

GC-MS/MS 装置は, GC 部に CP-3800 (Varian 社製), MS 部に GC-MS/MS1200 (Varian 社製) を用いた。

3. GC-MS/MS 測定条件

3.1 GC 条件

カラムは, Varian 社製 VF-5ms (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μm) を用いた。カラム温度は, 50℃ で 1 分間保持した後, 25℃/min で 150℃ まで, 5℃/min で 200℃ まで, 15℃/min で 280℃ まで昇温し, 5 分間保持した。さらに, 20℃/min で 300℃ まで昇温し, 4.67 分間保持した。注入口温度は 250℃, トランスファーライン温度は 270℃, カラム流量は 1.0 mL/min, 注入量は 2 μL (スプリットレス注入法) で測定した。

3.2 MS 条件

イオン化法は EI モード, 測定モードは MRM (multiple reaction monitoring), イオン源温度は 230℃, 四重極温度は 40℃ で測定した。各農薬の MRM 条件は Table 1 に示した。

3. 試験溶液の調製

試料 10.0 g を採り, 無水硫酸ナトリウム 25 g, 無水硫酸マグネシウム 5 g を加えて混和した後, アセトニトリル-エタノール (1:1) 混液 (以下, A-E 混液) 50 mL を加えて 3 分間ホモジナイズし, 吸引ろ過した。残さは A-E 混液 40 mL で洗い込みながら吸引ろ過し, ろ液を合わせ, A-E 混液で 100 mL に定容し, うち 40 mL を分取した。これを遠沈管に移し, -5℃, 3,000 rpm で 20 分間遠心分離した後, 上清を 45℃ 以下で減圧乾固した。残留物を A-E 混液 10 mL で溶解した後, 遠沈管に移し, 固相充填剤を加えて 2 分間振とうした。-5℃, 3,000 rpm で 5 分間遠心分離した後, 上清を多機能カラムに負荷した。はじめの通過液を正確に 5 mL 分取して, 45℃ 以下で減圧乾固した後, 残留物を内部標準 (フルオランテン- d_{10}) 含有アセトン-ヘキサン (1:1) 混液 1 mL で溶解した。これを 0.45 μm のフィルターに通し, 試験溶液とした (Scheme 1)。

4. 検量線の作成

GC-MS/MS 用混合標準溶液を内部標準含有酵母エキス抽出液で希釈し, 各農薬の濃度が 0.002, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ の溶液を調製した。試験溶液 2 μL を GC-MS/MS に注入し, MRM 法により得られたクロマトグラムのピーク面積を用いて内部標準法により検量線を作成した。

結果および考察

1. 抽出条件の検討

畜産物で検出事例の多い塩素系農薬¹⁾を含む多くの農薬は, 脂溶性が高く, 脂肪に残留しやすいため, 通知法〔畜水産物〕では, アセトン-ヘキサン (1:2) 混液で農薬を脂肪ごと抽出する方法が採用されている。しかし, アセトン-ヘキサン (1:2) 混液では, 極性の高い農薬の抽出が困難であること, 後述の冷却遠心分離による脱脂方法を用いたときに, 脱脂効率が低くなることから, 別の抽出溶媒を検討することにした。

Table 1. MRM trace and recovery in analysis of 131 pesticides by GC-MS/MS

Pesticide	MRM trace (<i>m/z</i>)	Recovery ^{a)} (%)											
		Cattle muscle			Swine muscle			Poultry muscle			Cattle liver		
		Mean	RSD		Mean	RSD		Mean	RSD		Mean	RSD	
Standard solution group (A)													
Acephate	136>42	10.5	5.5	15.1	7.8	15.0	7.8	6.1	5.4	5.8	1.9	6.7	8.6
Acetamprid	152>116	99.6	2.4	111.7	8.3	108.8	11.8	34.9	10.6	125.5	7.8	64.3	3.8
Azinphos-methyl	160>132	149.9	6.3	164.4	5.6	171.5	10.1	125.3	7.1	145.6	4.9	122.7	14.0
α -BHC	219>145	79.5	2.2	81.1	2.1	84.6	3.6	99.9	3.4	93.4	1.5	102.0	1.4
β -BHC	219>145	82.9	1.7	84.4	2.0	87.7	1.8	89.8	3.6	92.1	1.7	86.4	4.0
γ -BHC	219>145	75.3	2.4	79.2	2.9	83.3	2.5	92.9	2.2	87.4	2.5	97.9	3.6
δ -BHC	219>145	75.3	3.4	74.1	2.8	77.6	2.2	80.8	1.7	87.1	2.6	83.0	4.0
Bifenthrin	181>166	93.5	0.5	96.2	1.8	100.9	2.5	96.4	1.8	101.8	4.3	86.9	2.5
Bitertanol	170>115	87.8	3.2	94.9	4.2	91.9	7.8	111.9	1.9	107.6	2.8	79.7	2.2
Carbaryl	144>115	80.5	5.3	81.2	5.2	83.2	5.0	69.6	5.9	66.4	3.9	76.7	3.7
<i>E</i> -Chlorfenvinphos	267>159	84.1	2.3	92.0	1.0	94.9	3.6	79.3	3.2	95.8	1.3	88.0	3.9
<i>Z</i> -Chlorfenvinphos	267>159	85.2	2.1	89.8	2.6	89.2	4.1	73.5	3.6	94.7	3.3	97.2	2.5
Chlorpyrifos	314>258	83.9	8.9	89.2	2.6	89.3	2.6	75.4	1.8	81.1	3.4	83.5	2.3
Cyfluthrin	163>127	112.6	0.9	112.1	2.0	110.2	4.8	110.6	1.0	112.5	2.6	100.7	2.4
Cyhalothrin	197>141	120.6	2.0	128.6	3.0	125.2	5.9	103.0	1.6	106.1	2.6	93.2	2.5
Cypermethrin	163>127	107.1	2.3	106.3	2.6	106.2	5.1	105.7	1.7	110.5	1.3	96.0	1.2
<i>p,p'</i> -DDD	235>165	86.9	3.1	88.7	3.7	92.2	0.5	95.9	2.5	96.2	3.5	84.9	3.8
<i>p,p'</i> -DDE	246>176	76.8	6.5	74.4	4.3	77.5	5.9	71.6	3.5	83.5	3.2	64.1	4.8
Deltamethrin	253>174	96.4	4.1	87.2	8.1	89.1	6.5	54.0	6.5	54.3	3.8	53.0	2.9
Diazinon	179>137	94.3	2.0	97.2	2.0	101.1	1.5	104.3	2.7	96.4	1.3	91.3	4.4
Difenoconazole	323>265	91.5	3.4	97.8	3.5	93.5	1.8	102.8	2.1	104.4	2.2	89.4	1.8
Dimethipin	118>58	58.8	2.3	63.6	3.0	71.3	6.3	22.7	6.5	68.4	10.6	76.4	4.0
Dimethoate	125>79	0.0	—	0.0	—	0.0	—	45.1	5.6	68.1	2.9	94.9	2.5
α -Endosulfan	241>170	79.0	5.1	78.5	2.2	78.8	2.6	79.3	2.6	82.8	2.9	73.8	1.6
β -Endosulfan	241>170	81.5	1.5	82.7	4.1	80.3	2.8	79.8	2.3	86.9	4.4	72.7	3.1
Endosulfan-sulfate	272>237	79.2	5.3	95.4	4.9	94.3	3.7	84.7	3.0	86.5	2.4	83.6	1.9
Fenarimol	251>139	89.5	5.5	94.3	8.2	97.9	2.5	98.3	2.2	95.3	3.3	85.1	3.1
Fenitrothion	277>260	69.3	2.1	69.4	5.0	77.7	4.2	68.1	2.1	82.7	3.4	92.2	2.7
Fenpropathrin	265>181	97.8	4.7	98.3	1.8	99.0	6.1	91.7	2.7	97.8	4.4	89.1	2.1
Fenthion	278>109	79.6	7.1	85.0	3.0	79.4	2.2	81.1	4.3	83.1	2.8	93.6	2.7
Fenvalerate	225>119	110.1	4.9	112.8	5.6	109.5	6.5	114.5	1.9	122.9	1.9	104.3	3.3
Flucythrinate	199>157	113.0	2.2	110.3	1.8	112.3	3.9	112.2	2.4	113.4	2.5	98.6	3.5
Fludioxonil	248>127	83.2	5.2	94.2	4.0	94.0	6.5	81.4	2.2	79.2	4.1	75.7	4.2
Flusilazole	233>165	92.2	1.1	97.7	1.7	97.1	3.9	101.8	1.5	101.3	3.1	85.9	2.8
Flutolamil	173>145	95.5	4.8	100.3	2.2	105.2	7.3	109.8	2.7	102.5	1.9	105.4	3.1
Fluvalinate	250>200	109.6	2.9	107.1	3.3	107.9	3.0	71.7	4.1	79.6	2.8	88.8	2.2
Imazalil	215>145	83.9	2.4	87.4	4.7	90.5	2.9	96.8	4.6	107.5	1.7	70.7	4.7
Isofenphos	213>121	91.2	0.8	93.5	1.4	96.0	2.7	91.9	3.1	96.5	1.6	98.3	2.1

Table 1. Continued

Pesticide	MRM trace (<i>m/z</i>)	Recovery ^{a)} (%)									
		Cattle muscle		Swine muscle		Poultry muscle		Cattle liver		Cattle kidney	
		Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD
Diffenican	266>218	100.0	3.8	97.4	4.8	101.0	3.0	86.6	3.5	92.2	2.9
Diphenylamine	169>139	76.0	2.2	81.6	5.2	84.6	0.4	100.1	4.8	96.9	5.8
Disulfoton	142>109	66.8	6.9	78.0	8.9	70.4	7.7	93.6	4.3	97.6	3.7
Endrin	263>193	80.8	5.3	81.4	3.7	77.7	3.8	66.9	5.2	73.5	2.3
EPTC	128>86	33.1	3.0	52.1	4.9	48.7	9.8	63.1	6.5	42.2	5.3
Ethion	231>175	89.8	2.3	94.6	3.6	96.5	4.9	83.2	2.9	93.2	3.4
Ethofumesate	207>161	77.4	2.4	83.2	2.2	87.9	2.2	82.7	2.7	88.9	3.3
Ethoprophos	200>114	87.9	2.1	96.7	2.3	98.6	4.7	82.2	4.5	88.0	4.6
Etridiazol	211>183	50.6	5.7	64.8	6.6	66.8	6.4	70.2	4.0	53.9	6.5
Famphur	218>109	87.6	7.3	105.0	5.1	109.7	6.2	98.7	8.1	39.0	18.1
Fenamiphos	303>260	97.5	2.6	96.9	4.0	110.3	3.4	97.4	4.6	98.2	2.6
Fenbuconazole	198>102	95.8	1.7	100.0	3.6	104.6	4.6	114.0	3.6	112.7	3.5
Fenobucarb	150>121	89.2	5.0	94.9	1.4	95.8	2.0	102.9	2.4	99.9	3.3
Fenoxaprop-ethyl	361>288	99.9	2.4	98.7	2.2	104.0	3.6	76.8	3.8	91.8	2.7
Fenproimorph	128>70	83.3	2.0	87.2	6.5	82.9	2.2	93.6	2.6	86.0	2.7
Fipronil	367>213	96.9	1.8	97.3	2.4	104.8	4.1	83.1	1.7	85.0	3.0
Fluquinconazole	340>108	100.1	4.9	105.8	3.1	104.9	4.2	85.8	1.5	96.7	3.4
Fluridone	328>189	85.9	5.3	91.1	3.2	99.9	2.1	129.9	4.6	127.0	5.4
Flutriafol	219>95	82.5	4.0	91.5	2.4	109.5	2.7	101.7	4.3	95.3	2.9
Hexazinone	171>71	90.4	5.2	98.5	2.8	101.4	4.8	103.6	4.5	95.5	3.6
Isafenphos oxon	229>201	88.5	4.8	97.5	1.0	94.2	3.7	82.7	2.7	100.3	2.2
Isoprothiolane	290>204	94.9	3.0	102.0	3.6	100.9	4.5	81.2	2.8	86.4	3.2
Kresoxim-methyl	206>116	86.6	3.2	95.1	3.4	99.2	2.1	88.8	3.8	96.1	2.8
Metalaxil	206>132	82.7	2.1	88.6	2.0	97.5	0.8	101.6	3.5	94.8	2.1
Methoprene	153>111	90.1	4.6	94.8	2.6	94.5	1.8	87.2	3.1	98.2	3.1
Metribuzin	198>82	73.0	2.4	81.4	4.8	88.4	1.1	89.3	2.6	96.1	2.0
Norflurazon	303>145	102.0	4.4	110.9	2.3	107.7	4.5	94.8	1.9	93.0	3.8
Oxadiazon	175>112	82.8	2.8	89.0	2.4	92.1	1.5	89.6	3.8	92.3	3.7
Oxyfluorfen	252>170	93.0	2.3	95.2	3.5	101.1	0.7	82.7	4.7	93.8	3.1
Parathion	291>109	84.2	4.1	88.9	3.5	93.1	4.4	75.0	4.3	82.5	2.7
Parathion-methyl	263>109	76.0	6.0	80.4	2.0	84.8	1.9	72.6	4.3	89.3	4.5
Penconazole	248>157	82.6	1.9	89.3	2.2	92.3	1.7	82.6	2.2	85.1	1.2
Pendimethalin	252>162	77.3	3.8	82.6	1.7	83.4	2.9	87.6	3.1	87.7	2.5
Phorate	231>175	81.8	6.5	89.8	3.9	99.6	5.7	101.7	2.2	101.5	4.3
Phosmet	160>133	75.2	5.4	104.5	12.2	99.7	3.6	95.3	4.7	93.7	5.5
Picolinafen	376>145	103.5	6.2	99.3	4.7	105.3	2.5	89.3	4.0	91.6	2.4
Piperonyl butoxide	176>131	87.8	4.6	94.7	3.6	97.6	3.3	87.8	3.3	90.7	3.0
Prochloraz	308>70	109.3	3.3	103.6	3.5	105.8	2.3	102.8	1.9	107.1	2.7
Procymidone	283>96	76.0	4.5	84.3	2.1	84.6	2.4	84.6	3.1	84.6	3.2

Table 1. Continued

Pesticide	MRM trace (<i>m/z</i>)	Recovery ^{a)} (%)									
		Cattle muscle		Swine muscle		Poultry muscle		Cattle liver		Cattle kidney	
		Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD
Profenofos	Insecticide	82.0	7.4	94.2	3.0	95.3	2.7	73.5	5.0	81.3	3.0
Propanil	Herbicide	76.6	2.3	83.3	3.0	83.9	3.1	89.2	1.8	92.8	2.5
Propargite	parasiticide	97.9	3.9	99.6	4.6	99.5	1.7	128.1	6.4	122.6	6.2
Propetamphos	Insecticide	93.6	1.9	97.5	2.4	95.6	2.9	102.1	2.8	105.8	3.3
Propoxur	Insecticide	92.1	3.2	97.1	2.2	96.4	1.7	101.6	1.9	97.7	2.1
Propyzamide	Herbicide	83.1	1.9	88.6	1.5	90.5	2.3	95.2	4.2	102.7	3.6
Pyraclofos	Insecticide	103.9	3.9	109.9	5.8	109.6	6.3	118.0	4.1	124.8	4.6
Quinoxifen	Insecticide	90.9	3.7	93.6	2.7	96.3	2.8	74.8	3.0	73.1	3.6
Simazine	Herbicide	73.0	3.0	76.0	5.1	83.9	3.0	100.6	1.9	103.0	2.6
Terbutryn	Herbicide	77.2	1.6	82.3	3.0	77.3	4.2	83.4	2.8	80.5	1.8
Tetrachlorvinphos	Insecticide	24.0	3.8	41.4	15.2	61.0	6.0	20.1	7.4	72.9	3.8
Thiometon	Insecticide	66.7	2.9	66.0	5.3	70.4	8.0	96.9	4.0	100.1	4.6
Triadimefon	Fungicide	85.4	3.9	94.7	3.0	95.8	1.5	89.2	2.6	95.7	3.1
Triallate	Herbicide	74.7	6.1	80.2	2.4	81.3	8.2	71.6	3.4	73.5	3.2
Triazophos	Insecticide	108.4	2.0	86.8	5.4	101.4	8.4	96.2	3.7	87.3	2.2
Trifluralin	Herbicide	76.1	2.4	97.8	2.4	95.1	3.3	91.7	1.7	90.0	4.9
Vinclozolin	Insecticide	86.1	2.1	92.1	1.7	90.5	6.1	80.2	2.3	84.4	2.4
Fluoranthene- <i>d</i> ₁₀ ^{b)}	IS										
	212>208										

^{a)} Samples were spiked with 0.05 µg/g of 131 pesticides (*n*=5).^{b)} Internal standard

Shceme 1. Analytical procedure for pesticides

Newly developed steps in this study are shown in boxes.

抽出溶媒として、除タンパク効果が高く、極性の高い農薬も抽出されるアセトニトリルを検討したところ、脂肪をホモジナイズする際に、ホモジナイザーのシャフトに脂肪が付着した。これは、脂肪とアセトニトリルとの間で効率的な分配が行われず、農薬が十分に抽出されないことを示唆している²⁾。そこで、アセトニトリルに疎水性のエチル基と親水性のヒドロキシ基を持つエタノールを混合することで、脂肪の分散性の改善が可能を検討した。エタノールの混合割合が0 : 10, 3 : 7, 1 : 1, 7 : 3, 10 : 0となるよう調製した抽出溶媒を用いて、脂肪をホモジナイズしたときの脂肪の分散性と主な農薬の回収率を比較した ($n=3$)。農薬は、脂溶性の高い γ -BHCおよびクロルピリホス、中程度のカルバリル、水溶性の高いイマザリルを用いた。エタノールの混合割合が高くなるにつれて、脂肪の分散性が高くなり、シャフトへの脂肪の付着も改善され、農薬の回収率も高くなった。しかし、混合割合が1 : 1を超えると、農薬の回収率が低下したので、アセトニトリルとエタノールの混合比率は1 : 1とした (Fig. 1)。

また抽出時に、試料が筋肉部位の場合、筋肉繊維がホモジナイザーの刃の内部に入り込むため、これらの除去や刃の洗浄が必要となる。そこで、無水硫酸ナトリウムを加え

て、筋肉繊維の刃への絡まりを防止しながらホモジナイズした。さらに、無水硫酸ナトリウムより脱水効果の高い無水硫酸マグネシウム³⁾を同時に加えることで、溶媒留去前の脱水操作を省くことができた。

2. 精製条件の検討

家畜の筋肉、脂肪および内臓には、水分のほかにタンパク質や脂質が多く含まれている。特に脂質は、分析を繰り返すと、質量分析装置のイオン化部などに付着し、測定感を低下させてしまうため、脱脂に重点をおいた精製法について検討した。

Fig.1. Effect of the extracting solvent on recovery of pesticides from cattle fat

Fig. 2. Change in removal efficiency of fat with refrigerating temperature

Each point represents the mean $\pm$ S.D. ($n = 3$).

Fig. 3. Change in removal efficiency of fat with centrifugation time

Each point represents the mean $\pm$ S.D. ($n = 3$).

Table 2. Comparison of solid-phase extraction for recovery of 4 pesticides

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)	
	RC ^{b)} + DS ^{c)}	RC + DS + MC ^{d)}
γ -BHC	101.2	86.0
Carbaril	88.6	91.5
Chlorpyrifos	81.3	89.5
Imazalil	109.2	104.0

^{a)} Cattle fat extract were spiked with 5 ng/mL of 4 pesticides ($n = 3$).

^{b)} RC: Refrigerated centrifugation

^{c)} DS: Dispersive solid-phase extraction

^{d)} MC: Multifunctional column chromatography

GPC を用いない一般的な脱脂法として、 n -ヘキサンとの液-液分配による脱脂⁴⁾や抽出液を冷却することにより脂肪分を固化して分離する脱脂などがある。 n -ヘキサンの液-液分配は、エマルジョンを生じやすい欠点があるため、冷却による脱脂を選択した。今回、冷却による脱脂の中でも、冷却しながら脂肪分を短時間で分離することが可能な冷却遠心機を用いた脱脂法⁵⁾を採用した。

冷却遠心分離の条件は、温度と遠心時間について検討を行った。試料はウシの脂肪 1 g を A-E 混液 40 mL で溶解したものを用いた。これを各条件で冷却遠心分離した後、上清を 45°C 以下で減圧乾固を行い、残存した脂肪量を測定し、脂肪除去率を求めた。冷却温度の条件検討では、室

温 (25°C) で遠心分離したとき、脂肪の平均除去率は 58.6% であったが、冷却温度が低くなるごとに、除去率が上がり、-5°C では 81.3% となった。よって、冷却温度は安定した温度を維持できる機器上の最低温度である -5°C とした (Fig. 2)。一方、遠心時間の条件検討では、時間をかけるごとに除去率が上昇していき、20 分を過ぎるとほぼ一定になったため、冷却時間は 20 分とした (Fig. 3)。

また、脂溶性の高い農薬 (p,p' -DDE, ビフェントリン, フェンチオン) を添加した脂肪抽出液を前述の条件で冷却遠心分離したときの平均回収率 ($n = 3$) は、 p,p' -DDE が 109.9%, ビフェントリンが 107.8%, フェンチオンが 86.3% であり、良好な結果が得られた。

冷却遠心分離のみでは脂肪の除去が不十分であったため、冷却遠心分離と固相抽出を組み合わせた脱脂法を検討した。近年、簡便な固相抽出法として QuEChERS 法⁶⁾で用いられている分散固相抽出法がある。分散固相抽出法は、試料抽出液に固相抽出で用いられている充填剤を直接混合し、振とうおよび遠心分離のみで精製を行う簡便かつ迅速な精製法である。また、別の精製法として、逆相樹脂、陰イオン交換樹脂および陽イオン交換樹脂を混合した充填剤を用いた多機能カラムによる固相抽出法も報告されている⁷⁾。今回、冷却遠心と両者の精製法の組み合わせによる脂肪の除去効果を調べた。前述の冷却遠心分離の条件検討で用いた試料を分散固相抽出法および多機能カラムにより精製し、残存した脂肪量を測定して脂肪除去率を求めた。分散固相抽出法で使用する固相は、脂肪酸等の除去効果をもつ C18 と PSA を各 150 mg 含有しているスぺルコ社製の PSA/C18 SPE Clean Up Tube 1 を用い、多機能カラムは、残留農薬検査に適した Romer Labs 社製の Multisep PR を用いた。分画した抽出液 40 mL に固相充填剤を加え、-5°C、3,000 rpm で 20 分間冷却遠心したところ、脂肪の平均除去率は 77.6% であり、脂肪除去効果は見られなかった。そこで冷却遠心後、分散固相抽出法により精製すると 92.6% に向上した。さらに冷却遠心、分散固相抽出後に多機能カラムで精製すると 99.9% となり、ほぼ完全に脂肪を除去することができた。また、A-E 混液に 1. 抽出条件の検討で用いた農薬を添加したときの回収率は、分散固相抽出が 81.3~101.2%, 分散固相抽出法と多機能カラムの組み合わせが 86.1~104.0% であった。よって、脂肪除去率の高かった分散固相抽出法と多機能カラムを組み合わせた精製法を選択した (Table 2)。本法は、GPC を用いる従来法と比較して同等のクリーンアップ効果を持ち (Fig. 4)、1 回の調製による脂肪処理量が増加した (0.5 g から 10 g に増加)。また本法は、固相のコンディショニングが不要であり、GPC を用いず、精製操作が簡略化されたことで、試験溶液の調製時間短縮 (20 検体処理で 3 日から 1 日に短縮) および使用溶媒の削減 (20 検体処理で 10 L から 2 L に削減) が可能となった。

Fig. 4. GC-MS/MS multiple reaction monitoring total ion chromatograms of blank fat extracts after clean up

(1) GPC

(2) Dispersive solid-phase extraction and multifunctional column chromatography

Fig. 5. Calibration curves of Phosmet

(1) Standard solution prepared avoiding use of yeast extract

(2) Standard solution prepared using yeast extract

Table 3. Relative error of pesticide concentration measured by external standard method and internal standard method

Relative error ^{a)} (%)	Number of pesticides					
	Cattle muscle		Cattle kidney		Cattle fat	
	ES ^{b)}	IS ^{c)}	ES	IS	ES	IS
< 70	10	5	4	2	1	1
70 ≤, < 120	113	123	123	126	94	125
120 ≤	8	3	4	3	36	5

^{a)} Sample extracts were spiked with 0.1 µg/mL of 131 pesticides ($n=1$).

$$\text{Relative error} = \frac{\text{Analytical concentration} - \text{Theoretical concentration}}{\text{Theoretical concentration}} \times 100$$

^{b)} ES: external standard method

^{c)} IS: internal standard method

3. 検量線

GC-MS/MS 分析において、標準溶液と標準を添加した試験溶液を比較したところ、脂肪抽出液でマトリックス効

果による感度増強が見られた。そこで、フルオランテン- d_{10} を内部標準として用いた内部標準法と外部標準法の相対誤差を比較したところ、シフルトリン (132.4→

117.4%) など多くの農薬でマトリックス効果の低減が見られたため、内部標準法を用いることにした (Table 3)。しかし、内部標準含有アセトン-ヘキサン (1:1) 混液で希釈した GC-MS/MS 用混合標準溶液を用いて、検量線を作成したところ、ホスメットなど一部の農薬で、検量線が二次曲線様を示した。これは、標準溶液の農薬がガスクロマトグラフ分析時、注入口やカラムに吸着され、全体的に低濃度側のピーク面積が小さくなったことが原因であると思われる。これを改善するために、酵母エキス抽出液を用いた方法⁸⁾ が報告されており、酵母エキス抽出液を用いて標準溶液を調製したところ、農薬の吸着による問題が改善され、良好な直線性が得られた (Fig. 5)。検量線の直線性は、テフルトリンにおいて 0.002~0.5 µg/mL、その他の農薬において 0.02~0.5 µg/mL の範囲で、相関係数が 0.995~0.999 であり、良好であった。

定量下限は、各農薬において $S/N \geq 10$ あることを確認し、テフルトリンでは 0.001 µg/g、その他の農薬では 0.01 µg/g まで設定可能であった。

4. 添加回収試験

各試料に 131 農薬を添加して添加回収試験を行った。添加濃度は、基準値に多く設定されている 0.05 µg/g とした。その結果、ウシの筋肉、腎臓およびブタの筋肉で 117 農薬、ウシの肝臓および腎臓で 116 農薬、ニワトリの筋肉で 121 農薬が回収率 70~120%、相対標準偏差 15% 未満を満たしていた (Table 1)。

一方、シハロトリンなど一部のピレスロイド系農薬は、マトリックス効果により、回収率が高くなるものも見られた。また、アセフェート、アジンホスメチル、EPTC については、すべての試料で良好な回収率が得られなかった。アジンホスメチルは、マトリックス効果により回収率が高くなり、揮発性の高いアセフェートおよび EPTC は、濃縮時の揮散により回収率が低下したものと思われた。

ま と め

GC-MS/MS による畜産物中の残留農薬一斉分析法において、GPC を用いない試験溶液調製法について検討した。

抽出工程では、抽出溶媒に A-E 混液を用いることで、脂肪から効率的に農薬を抽出できることが推察された。精製工程では、冷却遠心分離に加え、分散固相抽出および多機能カラムによる精製を行うことで、試料中の脂肪を完全に除去することができた。また、試験溶液の調製時間の短縮および使用溶媒の削減が可能となった。

以上のことから、本法は簡便かつ迅速な畜産物中の残留

農薬一斉分析法として有用であると考えられる。

謝 辞

本研究に際し、ご助言をいただきました静岡県立大学食品栄養科学部の米谷民雄特任教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Matsumoto, H., Kuwabara, K., Murakami, Y., Murata, H. Survey of PCB and organochlorine pesticide residues in meats and processed meat products collected in Osaka, Japan. *Shokuhin Eiseikagaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **47**, 127-135 (2006).
- 2) Makabe, Y., Miyamoto, F., Hashimoto, H., Nakanishi, K., Hasegawa, Y. Determination of residual pesticides in processed foods manufactured from livestock foods and seafoods using ion trap GC/MS. *Shokuhin Eiseikagaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **51**, 182-195 (2010).
- 3) Okamoto, Y., Takatori, S., Kitagawa, Y., Okihashi, M., Hukui, N., Murata, H., Sumimoto, T., Tanaka, Y., Obana, H. Determination of pesticides in Chinese dumplings using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Shokuhin Eiseikagaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **50**, 10-15 (2009).
- 4) Amakawa, E., Ogiwara, T., Miyakoda, M., Nagayama, T. Analysis of Sudan dyes in oyster sauce using TLC and HPLC. *Tokyo Kenko Anzen Kenkyu Senta Kenkyu Nenpo (Annual Report of Tokyo Metropolitan Institute of Public Health)*, **56**, 141-144 (2005).
- 5) Miyakoda, M., Amakawa, E., Nagayama, T. Rapid determination of sodium azide mixed in food. *Tokyo Kenko Anzen Kenkyu Senta Kenkyu Nenpo (Annual Report of Tokyo Metropolitan Institute of Public Health)*, **57**, 215-218 (2006).
- 6) Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., Schenck, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.*, **86**, 412-431 (2003).
- 7) 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 Eiseikagaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **37**, 195-201 (1996).
- 8) Ogawa, T., Okamoto, N., Taniguchi, K., Yamashita, K., Nishida, S., Higuchi, H. Analysis of acephate and methamidophos in agricultural products by GC. *Shokuhin Eiseikagaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **38**, 204-210 (1997).