

食品中残留農薬試験の迅速化についての検討

有留裕太¹⁾ 野口翔 越智洋²⁾ 安部留美子³⁾ 寺山晃司 富山典孝⁴⁾

Examination on Speeding up Resident Pesticide Test in Food

Yuta ARIDOME, Sho NOGUCHI, Hiroshi OCHI, Rumiko ABE,
Kohji TERAYAMA, Noritaka TOMIYAMA

要旨

食品に残留する農薬に関する試験法について、試験の迅速化を目的として抽出・精製の作業工程の検討を行った。農産物については抽出キットを用いた塩析法、畜産物については分散固相カラム及び多機能カラムによる精製法等を行うことにより作業工程を見直した。その結果、作業時間が短縮され、従来の方法よりも短時間で抽出・精製工程を終了させることができるようになった。

また、農産物4種類（みかん・梨・トマト・かんしょ）、畜産物1種類（鶏肉）の合計5種類の食品について、今回見直した方法を用いて妥当性評価ガイドラインに基づく妥当性評価を行った。その結果、GC/MS 対象農薬ではみかん 165 農薬、梨 181 農薬、トマト 169 農薬、かんしょ 177 農薬、鶏肉 95 農薬で、LC/MS/MS 対象農薬ではみかん 72 農薬、梨 83 農薬、トマト 84 農薬、かんしょ 87 農薬、鶏肉 19 農薬で妥当性が確認できた。

キーワード：残留農薬試験 迅速化 妥当性評価

はじめに

食品に残留する農薬に関する試験法については、厚生労働省が通知¹⁾により定めており、当研究所でもこの方法に基づき試験を実施している。当研究所では農産物・畜産物合わせて年間約 80 検体の収去検査を実施しており、保健所による検体搬入から前処理、抽出・精製、機器分析、解析を経て、約 2 週間で試験検査結果通知書を発行している。

しかし、抽出・精製においては、作業に約 2～3 日を費やしていること及び使用する有機溶媒の量が多いことから、作業者の身体的負担が大きいという問題点があった。

そこで、抽出・精製の作業工程の改善を検討し、試験法全体の迅速化を行ったので報告する。

また、試験法の妥当性を評価するため、厚生労働省が妥当性評価ガイドライン²⁾（以下、「ガイドライン」という。）を策定しており、各機関で定めた

試験法についてはガイドラインに基づく妥当性評価を行うことが求められている。そこで、今回検討した方法で妥当性評価を行ったので、その結果についても報告する。

方法

1 農産物を対象品目とする場合の試験方法

1) 試料

対象農薬を含まないことを事前に確認した宮崎県産のみかん、梨、トマト及びかんしょを試料とした。

2) 対象農薬

GC/MS については農薬 224 項目、LC/MS/MS については農薬 95 項目を対象とした。農薬混合標準溶液については GC/MS は和光純薬工業製の PL-1-2, PL-2-1, PL-3-3, PL-4-2, PL-5-1, PL-6-3, PL-11-2 及び PL-12-1 を、LC/MS/MS は林純薬工業製の Mix4～7 を用いた。

衛生化学部 ¹⁾ 現 消防保安課 ²⁾ 現 小林保健所 ³⁾ 現 都城保健所 ⁴⁾ 現 環境管理課

3) 試薬

アセトニトリル及びトルエンは和光純薬工業 アジレント・テクノロジー製 Bond Elut (1g/6mL), ENVI-Carb/PSA カラムは SUPELCO 製 ENVI-Carb II /PSA (500mg/500mg, 6mL) を用いた。

4) 測定条件

GC/MS の測定条件を表 1 に、LC/MS/MS の測定条件を表 2 に示した。

表 1 GC/MS 測定条件

測定機器	Agilent 7890GC/5975MSD
使用カラム	HP-5MS (アジレント・テクノロジー(株)製)、 φ0.25mm×30m、膜厚0.25 μm
昇温条件	70°C (2分) → 25°C/分 → 150°C → 3°C/分 → 200°C → 8°C/分 → 280°C → 20°C/分 → 300°C (5分)
注入口温度	250°C
注入方法	スプリットレス
注入量	2 μL

表 2 LC/MS/MS 測定条件

測定機器	AB SCIEX 3200QTRAP
使用カラム	Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス製)、 φ2.1mm×150mm、膜厚3 μm
移動相	A液: 5mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 B液: 5mmol/L 酢酸アンモニウムメタノール溶液
グラジエント条件	B液%: 15 (0分) → 15 (1分) → 40 (3.5分) → 50 (6分) → 55 (8分) → 95 (17.5分) → 95 (30分) → 15 (35分)
カラム温度	40°C
流速	0.20mL/分
注入量	5 μL

5) 試験溶液の調製^{3) 4)}

試料 10g にアセトニトリル 10mL を加え、セラミックホモジナイザー 2 個で 1 分間ホモジナイズを行った。そこに抽出キット (塩化ナトリウム 1g, クエン酸 3 ナトリウム 2 水和物 1g, クエン酸水素 2 ナトリウム 1.5 水和物 0.5g 及び無水硫酸ナトリウム 4g の混合物) を添加し、振とう機で 1 分間振とうし、3,500 回転/分で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を 5mL 分取した。分取液を種類の違う精製用カラム (C18 カラム及び ENVI-Carb/PSA カラム) を 2 連結したものに負荷させ、アセトニトリル 5mL 及びアセトニトリル:トルエン (3:1) 20mL で溶出させた。溶出液をエバポレーター及び窒素ガスにより濃縮乾固させ、GC/MS 用試験溶液はアセトン 1mL, LC/MS/MS 用試験溶液はメタノール 1mL でそれぞれ溶解し、これを試験溶液とした。

6) 検量線

GC/MS 用検量線は 0.01~1 μg/mL, LC/MS/MS 用

製を用いた。

抽出キットは RESTEK 製 Q-sep, C18 カラムは検量線は 0.005~1 μg/mL の範囲で作成した。

2 畜産物を対象品目とする場合の試験方法

1) 試料

対象農薬を含まないことを事前に確認した宮崎県産の鶏肉を試料とした。

2) 対象農薬

GC/MS については農薬 125 項目, LC/MS/MS については農薬 45 項目を対象とした。農薬混合標準溶液については GC/MS は和光純薬工業製の PL-1-2, PL-2-1, PL-3-3, PL-4-2, PL-9-2, PL-11-2, PL-12-1 及び PL-13-1 を, LC/MS/MS は和光純薬工業製の PL-7-2, PL-15-1 及び PL-17-2 を用いた。

3) 試薬

アセトニトリル, エタノール, 無水硫酸ナトリウム及び無水硫酸マグネシウムは和光純薬工業製を用いた。分散固相カラム (C18/PSA カラム) は SUPELCO 製 SPE clean up TUBE1 を, 多機能カラムは昭和電工製 MultiSep PR を用いた。

4) 測定条件

GC/MS の測定条件は表 1 と同様である。LC/MS/MS の測定条件は表 2 の「グラジエント条件」の最後を 35 分から 30.5 分に変更しており、ほかは表 2 と同様である。

5) 試験溶液の調製⁵⁾

試料 10g に無水硫酸ナトリウム 25g, 無水硫酸マグネシウム 5g 及びアセトニトリル:エタノール (1:1) 50mL を加え, ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズを行った。3,500 回転/分で 5 分間遠心分離した後, 上澄み液を分取した。残留物にアセトニトリル:エタノール (1:1) 40mL を加え 5 分間振とうし, 吸引ろ過により得たる液を先ほどの分取液と合わせ, アセトニトリル:エタノール (1:1) で 100mL に定容した。

定溶液から 40mL を分取し, エバポレーター及び窒素ガスで濃縮乾固させ, 残留物をアセトニトリル:エタノール (1:1) 10mL で溶解し, 分散固相カラム (PSA/C18 カラム) が入った遠沈管に全量を負荷させた。遠沈管を振とう機で 2 分間振とうし, 3,500 回転/分で 5 分間遠心分離した後, 上澄み液を多機能カラムに負荷させ, 最初に通過した 5mL を分取した。分取液をエバポレーター及び窒素ガ

スにより濃縮乾固させ、GC/MS 用試験溶液はアセトン 1mL、LC/MS/MS 用試験溶液はメタノール 1mL で溶解し、これを試験溶液とした。

6) 検量線

GC/MS 用検量線は 0.01~1 μ g/mL、LC/MS/MS 用検量線は 0.005~1 μ g/mL の範囲で作成した。

結果及び考察

1 抽出・精製工程の検討

1) 農産物

改善を行った工程は大きく 2 点ある。

1 点目はホモジナイズについてである。従来の方法ではポリトロンホモジナイザーを使用したホモジナイズを行っており、1 検体ずつの処理となるため一度に多数の検体を処理できず、またホモジナイザーの刃を洗浄するための処理時間（1 検体あたり 1~2 分）と有機溶媒（約 60mL）を必要としていた。

2 点目は塩析（抽出・精製）法についてである。従来の方法では分液漏斗を用いた塩析法による精製を行っており、振とう後有機層と水層が充分分離するまで 1 時間程度静置させる必要があった。

今回、この 2 つの工程を改善し、抽出キットを用いた塩析法を用いることとした。ポリトロンホモジナイザーの代替としてディスポタイプであるセラミックホモジナイザーを 2 個使用することで一度に多数の検体の処理が可能となった。また分液漏斗の代替として同じくディスポタイプである 50mL 遠沈管を使用し、振とう後遠心分離を行うことで、有機層と水層を速やかに分離させることが可能となった。

2) 畜産物

改善を行った工程は大きく 2 点ある。

1 点目はホモジナイズに使用する有機溶媒についてである。従来の方法ではアセトン:n-ヘキサン(1:2)の混合溶媒を使用していた。しかしこの混合溶媒を使用した場合、極性の高い農薬の抽出が困難であることから、極性の高い農薬も抽出可能なアセトニトリルと、疎水基と親水基の両方を持ったエタノールの混合溶媒を使用することで、畜産物に含まれる脂肪の分散性を高めながら農薬の回収率も高めることができるとの報告があった⁵⁾ため、アセトニトリル:エタノール(1:1)の混合溶

媒を使用することとした。

2 点目は精製法についてである。従来の方法ではゲル浸透クロマトグラフィーによる精製を行い、脂肪を除去していた。しかし、操作が煩雑な上に、1 検体につき処理時間を 1 時間程度要していた。そのため、操作の簡易化及び処理時間の短縮を目的として、分散固相カラム及び多機能カラムによる精製法⁵⁾を行うこととした。

3) 検討結果

抽出・精製工程における作業時間が大幅に短縮された。従来の方法では農産物で約 2 日、畜産物で約 2~3 日要していた作業時間が、改善後は農産物・畜産物ともに約 1 日で終了することができるようになった。加えて、従来の方法よりも複雑な操作を必要としないため、作業者の熟練度に関係なく精度の高い試験が可能になると考えられた。

また、抽出・精製工程での有機溶媒の使用量も大幅に減少した。従来の方法では農産物で 1 検体あたり 140mL、畜産物で 1 検体あたり 512mL 使用していた有機溶媒が、改善後は農産物で 57mL と約 3 分の 1 に、畜産物で 112mL と約 5 分の 1 に減少した。

加えて、抽出・精製工程で使用する分液漏斗等のガラス器具がディスポタイプの遠沈管等一部使い捨て可能な器具となったことで、器具洗浄に使用する有機溶媒の量も減少した。

2 妥当性評価結果

今回検討した抽出・精製工程による試験法で各試料を用いた添加回収試験を行い、対象農薬ごとに妥当性の評価を行った。

今回の試験で使用した混合標準溶液は、各試料に添加したときの濃度が 0.01 μ g/mL 及び 0.1 μ g/mL となるように調製した。

それぞれの濃度について、農産物は分析者 1 名が 1 日 2 併行で 5 日間の試験を、畜産物は分析者 2 名が 1 日 2 併行で 3 日間の試験を行い、その結果を表 3 から表 6 に示した。なお、各試料において以下 1) から 3) の評価項目をすべて満たす農薬を、その試料での妥当性評価に適合する農薬であるとした。

1) 選択性

各試料の試験結果に、定量を妨害するピーク(妨

害ピーク)がないことを確認した。妨害ピークを認める場合は、ガイドラインに記載された許容範囲に基づき評価を行った。

2) 真度及び精度

各試料の試験結果の平均値の添加濃度に対する比(これを真度とする)並びに併行精度及び室内精度を求め、ガイドラインに記載された目標値に基づき評価を行った。

3) 定量限界

添加濃度 $0.01 \mu\text{g/mL}$ の試料溶液で得られたピークが S/N 比 ≥ 10 であることを確認した。

まとめ

食品に残留する農薬の試験法について、厚生労働省の通知に基づいた従来の方法のうち抽出・精製方法の検討を行ったところ、作業時間の短縮、操作の簡素化及び有機溶媒の削減につながった。

また、検討した方法で妥当性評価を行ったところ、GC/MS ではみかん 165 農薬、梨 181 農薬、トマト 169 農薬、かんしょ 177 農薬、鶏肉 95 農薬で、LC/MS/MS ではみかん 72 農薬、梨 83 農薬、トマト 84 農薬、かんしょ 87 農薬、鶏肉 19 農薬で妥当性が確認できた。

現在、当研究所では今回見直した方法により収去検査を行っている。

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（食安発第 0124001 号），平成 17 年 1 月 24 日
- 2) 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
- 3) 伴創一郎，並河幹夫，出口夫美子，和田好生，折戸太一，伴埜行則，川上雅弘：QuEChERS 改良法による農産物中残留農薬一斉分析法の妥当性評価，京都市衛生公害研究所年報，76，75-88，(2010)
- 4) 榎元清美，岩屋あまね，臼井力，吉村浩三：LC-MS/MS を用いた農産物中の残留農薬迅速分析法の検討，鹿児島県環境保健センター所報，15，58-64，(2014)
- 5) 近藤貴英，蕪木康郎，柴田雅久，黒川千恵子，井上豊，山本喜彦，宮崎元伸：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，食品衛生学雑誌，53(2)，75-84，(2012)

表5 GC/MS 対象農薬の妥当性評価結果 (畜産物)

番号	評価農薬名	鶏肉				妥当性	番号	評価農薬名	鶏肉				妥当性
		選択性	真度、精度		定量 限界				選択性	真度、精度		定量 限界	
			0.01 ug/mL	0.1 ug/mL						0.01 ug/mL	0.1 ug/mL		
1	DDD	○	○	○	○	○	64	バラチオンメチル	○	○	○	○	○
2	DDT	○	○	○	○	○	65	ピオレスメリン	○	○	○	○	○
3	EPTC	×	×	×	○	×	66	ピコリナフェン	○	○	○	○	○
4	アジンホスメチル	○	○	○	○	○	67	ピテルタノール	×	○	○	○	×
5	アトラジン	○	○	○	○	○	68	ピフェントリン	○	○	○	○	○
6	アラクロール	○	○	○	○	○	69	ピベロニルプトキシド	○	○	○	○	○
7	アルドリン、ディルドリン	×	○	×	○	×	70	ピラクロホス	○	○	○	○	○
8	アレスリン	○	○	○	○	○	71	ピリダベン	○	○	○	○	○
9	イソプロチオラン	×	×	○	○	×	72	ピリプロキシフェン	○	○	○	○	○
10	イブロジオン	×	○	○	○	×	73	ピリミカーブ	○	○	○	○	○
11	イマザリル	×	○	○	○	×	74	ピリミホスメチル	○	○	○	○	○
12	エチオン	○	○	○	○	○	75	ピレトリン	×	×	×	×	×
13	エトフメセート	○	○	○	○	○	76	ピンクロゾリン	○	○	○	○	○
14	エトプロホス	○	○	○	○	○	77	ファムフル	○	○	○	○	○
15	エトリジアゾール	×	×	×	○	×	78	ファモキサドン	×	○	×	○	×
16	エボキシコナゾール	○	○	○	○	○	79	フィブロニル	○	○	○	○	○
17	エンドスルファン	×	×	○	×	×	80	フェナミホス	○	○	○	○	○
18	エンドリン	○	○	○	○	○	81	フェナリモル	○	○	○	○	○
19	オキサジアゾン	○	○	○	○	○	82	フェニトロチオン	○	○	○	○	○
20	オキサベトリニル	○	○	○	○	○	83	フェノキサプロップエチル	○	○	○	○	○
21	オキシフルオルフェン	○	○	○	○	○	84	フェノブカルブ	○	○	○	○	○
22	カルフェントラゾンエチル	○	○	○	○	○	85	フェンアミドン	○	○	○	○	○
23	カルボキシシ	○	○	○	○	○	86	フェンチオン	○	○	○	○	○
24	キノキシフェン	○	○	○	○	○	87	フェンバレレート	○	○	○	○	○
25	キントゼン	○	○	○	○	○	88	フェンブコナゾール	○	○	○	○	○
26	クレソキシムメチル	○	○	○	○	○	89	フェンプロバトリン	○	○	○	○	○
27	クロルデン	○	○	○	○	○	90	フェンプロビモルフ	○	○	○	○	○
28	クロルピリホス	○	○	○	○	○	91	ブプロフェジン	○	○	○	○	○
29	クロルピリホスメチル	○	○	○	○	○	92	フラチオカルブ	○	○	○	○	○
30	クロルフェナビル	○	○	○	○	○	93	フルキンコナゾール	○	○	○	○	○
31	クロルフェルビンホス	○	○	○	○	○	94	フルシトリネート	○	○	○	○	○
32	クロルフェンゾン	○	○	○	○	○	95	フルシラゾール	○	○	○	○	○
33	クロルベンシド	×	○	○	○	×	96	フルトラニル	○	○	○	○	○
34	クロルネブ	×	×	×	○	×	97	フルフェナセット	○	○	○	○	○
35	クロルベンジレート	○	○	○	○	○	98	フルフェンビルエチル	○	○	○	○	○
36	ジコホール	×	○	○	○	×	99	フルリドン	○	○	○	○	○
37	ジスルホトン(エチルチオメトン)	○	○	○	○	○	100	ブロクロラズ	○	○	○	×	×
38	シハロトリン	○	○	○	○	○	101	ブロシミドン	○	○	○	○	○
39	ジフェニルアミン	○	○	○	○	○	102	ブロバキサホップ	○	○	○	○	○
40	ジフェノコナゾール	○	○	○	○	○	103	ブロバニル	○	○	○	○	○
41	シフルトリン	×	○	○	×	×	104	ブロバルギット	○	×	○	○	×
42	ジフルフェニカン	○	○	○	○	○	105	ブロビコナゾール	○	○	○	○	○
43	シプロコナゾール	○	○	○	○	○	106	ブロビザミド	○	○	○	○	○
44	シベルメトリン	×	×	×	○	×	107	ブロフェノホス	○	○	○	○	○
45	シマジン(CAT)	○	○	○	○	○	108	ブロベタンホス	×	○	○	○	×
46	スピロキサミン	○	○	×	×	×	109	ブロモプロピレート	○	○	○	○	○
47	ダイアジノン	○	○	○	○	○	110	ヘキサクロロベンゼン	○	×	×	○	×
48	チオベンカルブ	○	○	○	○	○	111	ヘプタクロル	○	○	○	○	○
49	テトラクロルピホス	○	×	×	○	×	112	ベルメトリン	○	○	○	○	○
50	テブコナゾール	○	○	○	○	○	113	ベンコナゾール	○	○	○	○	○
51	テフルトリン	○	○	○	○	○	114	ベンディメタリン	○	×	○	○	×
52	デルタメトリン及びトラロメトリン	○	○	○	○	○	115	ボスカリド	○	○	○	○	○
53	テルブトリン	○	○	○	○	○	116	ホスメット	○	○	×	○	×
54	テルブホス	○	○	○	○	○	117	ホレート	×	×	×	○	×
55	トリアジメノール	×	○	○	○	×	118	マラチオン	○	○	○	○	○
56	トリアジメホス	○	○	○	○	○	119	ミクロブタニル	○	○	○	○	○
57	トリアゾホス	○	○	○	○	○	120	メタクリホス	×	○	○	○	×
58	トリアレート	○	○	○	○	○	121	メチダチオン	○	○	○	○	○
59	トリチコナゾール	○	○	○	○	○	122	トキシシクロ	○	○	○	○	○
60	トリフルミゾール	×	○	○	×	×	123	トブレ	×	×	×	×	×
61	トリフルラリン	○	○	○	○	○	124	トラクロー	○	○	○	○	○
62	ニトラピリン	○	×	×	○	×	125	レスメトリン	○	○	○	○	○
63	バラチオン	○	×	○	○	×							

適合農薬数 104 110 111 118 95

○:適合 ×:不適合

表6 LC/MS/MS 対象農薬の妥当性評価結果 (畜産物)

番号	評価農薬名	鶏肉				妥当性	番号	評価農薬名	鶏肉				妥当性			
		選択性	真度、精度		定量 限界				選択性	真度、精度		定量 限界				
			0.01 ug/mL	0.1 ug/mL						0.01 ug/mL	0.1 ug/mL					
1	アメトリン	○	×	○	○	×	24	フルフェナセット	○	×	○	○	×			
2	バーバン	○	○	○	○	○	25	ヘキシチアゾクス	○	○	○	○	○			
3	ベナラキシル	○	×	○	○	×	26	ルフェヌロン	○	○	○	○	○			
4	ベンフラカルブ	○	×	○	○	×	27	メフェンビルジエチル	○	×	○	○	×			
5	カルボフラン	○	○	○	○	○	28	メキシフェノジド	○	×	○	○	×			
6	3-オ-エイチカルボフラン	○	×	○	○	×	29	オキサベトリニル	○	○	○	○	○			
7	ブタフェナシル	○	×	○	○	×	30	ホキシム	○	×	○	○	×			
8	カルフェントラゾンエチル	○	×	○	○	×	31	プロメトリン	○	×	○	○	×			
9	クロルブファム	○	○	○	○	○	32	プロバキサホップ	○	×	○	○	×			
10	クオルフルアズロン	○	×	×	○	×	33	ピラクロストロピン	○	×	○	○	×			
11	クロジナホッププロパルギル	○	×	×	○	×	34	ピラゾホス	○	×	○	○	×			
12	クロフェンテジン	○	×	×	○	×	35	ピリメタニル	○	○	○	○	○			
13	クロキントセットメキシル	○	○	○	○	○	36	キザロホップエチル	○	×	○	○	×			
14	シプロジニル	○	○	○	○	○	37	トリフロキシストロピン	○	×	○	○	×			
15	ジフルベンズロン	○	○	○	○	○	38	トリフルミゾール	○	○	○	○	○			
16	エボキシコナゾール	○	○	○	○	○	39	トリフルミゾール代謝物	○	×	○	○	×			
17	エトキサゾール	○	×	○	○	×	40	トリフルムロン	○	○	○	○	○			
18	フェンアミドン	○	×	○	○	×	41	ボスカリド	○	×	○	○	×			
19	フェンプロピモルフ	○	○	○	○	○	42	リニューロン	○	○	○	○	○			
20	フェンピロキシメートE	○	○	○	○	○	43	ノバルロン	○	×	○	○	×			
21	フェンピロキシメートZ	○	○	○	○	○	44	テブフェノジド	○	×	○	○	×			
22	フラムプロップメチル	○	○	○	○	○	45	テフルベンズロン	○	○	○	○	○			
23	フルアズロン	○	×	○	○	×										
						適合農薬数						45	19	42	45	19