

30. 迅速簡便な

残留農薬一斉分析法の開発

○吉光 真人 (地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所)

【研究目的】

残留基準を超過する作物の流通を防止するため、当所では青果物の残留農薬検査を実施している。検査対象とする農薬数は約 200、作物数は 70 以上であり、これらの多種多様な組み合わせに対応するため、一斉分析法を導入している。しかし、現行法は精製操作での溶媒使用量が多く、その減圧濃縮に時間と専用器具を要する。そこで本研究では、これらの手順を簡略化し、迅速簡便な残留農薬分析法を確立することを目指す。

【研究の必要性】

農作業の効率化、また農作物の収量の維持、向上のため、農薬の適正使用は必要である。一方、収穫後の作物には使用した農薬が残留することがあり、これを残留農薬という。ヒトに対する健康被害を防止する目的で、残留農薬は作物ごとに残留基準が定められている。

基準を超過した作物の流通を防止するため、地方衛生研究所等では検査を実施し、残留農薬の実態を監視している。現在、日本で登録されている農薬の有効成分数は約 600 で、作物数は 70 以上である。このような多種多様な農薬、作物の組み合わせに対応するため、各検査機関では、より効率的な一斉分析法が求められている。

当所においても一斉分析法を採用しているが、作物から農薬を抽出した溶液を固相カートリッジカラムで精製する際、多量の溶媒を使用するため、環境への負荷が大きい。また、その後の溶媒の減圧濃縮操作で長時間を要し、かつ専用のガラス器具を使用することから、検査効率化の点で問題となっている。そこで、本研究では、カラム精製において、食品成分のみを保持し、農薬を保持しないカラムを用い、使用溶媒量を削減する。また、同時に多検体処理が可能な遠心エバポレータによる減圧濃縮を用いた、迅速簡便な分析法の確立を目指す。

【研究計画】

1. 試料

農薬が残留していないことを確認したオレンジ、ほうれんそう、玄米、キャベツ、ネギ、パイナップルの 6 試料を用いた。

2. 試薬

農薬標準品は、残留農薬分析用標準品もしくはその同等品合計 221 項目を用いた。これらアセトンに溶解し、2.5 µg/mL 農薬混合標準溶液として用いた。溶媒等の試薬は残留農薬分析用、もしくはその同等品を用いた。固相カートリッジカラムは Oasis PRiME HLB Cartridge 6 cc/200 mg (HLB)、および Sep-Pak PSA Plus Light 130 mg/0.3 mL (PSA) (以

上 Waters 社製) を用いた。GC-MS/MS 分析時の内部標準としてトリフェニルリン酸 (TPP) (一級) (富士フィルム和光純薬 (株) 製) を、アナライトプロテクタントとして SFA10Mix (10 種類混合) 各 200 µg/mL (SFA) (林純薬工業 (株) 製) を用いた。TPP 溶液は、TPP をアセトンに溶解し、アセトン：ヘキサン混合溶液 (1：1) (A/H) を用いて 200 µg/mL の濃度となるように調製した。

3. 分析装置、分析カラム

LC-MS/MS は ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-S、分析カラムは ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 µm, 2.1 mm X 100 mm (以上 Waters 社製) を用いた。GC-MS/MS は 7890A/7000B、分析カラムは DB-5ms UI, 30 m, 0.25 mm, 0.25 µm (以上 Agilent 社製) を用いた。

4. 試験溶液、検量線の調製

抽出溶液の調製：玄米以外の試料の抽出溶液の調製は既報¹⁾に従った。玄米は、試料量 5 g に精製水 5 mL を添加した。以降の操作は既報¹⁾に従った。

試験溶液の調製：HLB に抽出溶液 4 mL を負荷し、溶出液を廃棄した後、HLB にアセトニトリル 1 mL を負荷し、溶出液を回収した。PSA に回収した溶出液を全て負荷し、その溶出液を回収した。さらにアセトニトリル 1 mL を負荷し、溶出液を合わせてアセトニトリルで 2 mL に定容した。

GC-MS/MS 測定用試験溶液の調製：試験溶液 1 mL を遠心エバポレータで乾固後、0.5 mL の A/H に再溶解した。ガラスインサートバイアルに再溶解した試験溶液 0.2 mL、TPP 溶液 0.1 mL、SFA 0.1 mL を添加、混合したものを測定用試験溶液とした。

LC-MS/MS 測定用試験溶液の調製：50% (v/v) アセトニトリル水溶液、かつ試料の希釈率が 200 倍となるように、バイアルに試験溶液、精製水、およびアセトニトリルを添加、混合したものを測定用試験溶液とした。

検量線の調製：GC-MS/MS 用には A/H、LC-MS/MS 用にはアセトニトリルを用い、農薬混合標準溶液を希釈して検量線用標準溶液を調製した。GC-MS/MS 用検量線は、試料の測定用試験溶液と同一の濃度となるように、検量線用標準溶液に TPP 溶液および SFA を添加し、調製した。LC-MS/MS 用検量線は、50% (v/v) アセトニトリル水溶液となるように、バイアルに検量線用標準溶液、精製水、およびアセトニトリルを添加、混合して調製した。

5. 添加回収試験

6 試料について、50 ppb の濃度となるように農薬混合標準溶液を添加し、5 併行の添加回収試験を実施した。

【実施内容・結果】

農薬混合標準溶液に含まれる農薬のうち、用いた機器で測定可能であった、GC-MS/MS 107 項目 (表 1)、LC-MS/MS 108 項目 (表 2) を測定対象とした。共通の 2 項目は下線を付した。

表1. GC-MS/MS 分析対象農薬

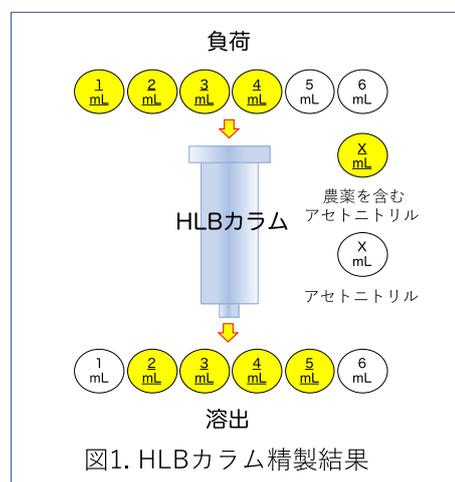
BHC (γ)	シフルフェナミド	ビラフルフェンエチル	プロフェノホス
EPN	シプロジニル	ビリダフェンチオン	プロマシル
イサゾホス	シマジン	ビリダベン	プロメトリン
イプロベンホス	ジメチルビンホス	ビリフェノックス	プロモホス
エタルフルラリン	シメトリン	ビリブチカルブ	ヘプタクロル
エチオン	ジメピペレート	ビリミジフェン	ヘプタクロルEA
エディフェンホス	シラフルオフエン	ビリミノバックメチル	ヘプタクロルEB
エトフェンブロックス	スルプロホス	ビリミホスメチル	ベルメトリン
エトプロホス	ターバシル	ビシクロソリン	ペンフルラリン
エトリムホス	ダイアジノン	フェナリモル	ペンフレセート
オキサジアゾン	チオメトン	フェニトロチオン	ホレート
カルフェントラゾンエチル	チフルザミド	フェノキサニル	マラチオン
キナルホス	テトラクロルビンホス	フェンクロルホス	メチダチオン
キノキシフェン	テトラジホソ	フェントエート	メトキシクロール
キノクラミン	テフルトリン	フェンプロバトリン	メトミノストロビン
キントゼン	テルプトリン	フサライド	メフェンビルジエチル
クROMEプロップ	トリアゾホス	ブタクロール	メプロニル
クロータールジメチル	トリアレート	ブタミホス	
クローリホス	トリブホス	フリラゾール	
クローリホスメチル	トリフルラリン	フルアクリリム	
クローフェンソソ	トルクロホスメチル	フルジオキシニル	
クローペンシド	トルフェンピラド	フルトラニル	
クローペンジレート	ナフチルアセタミド	フルミオキサジン	
シアノホス	ニトロタールイソプロピル	プロシミドン	
ジクロトホス	バラチオン	プロチオホス	
ジクロフェンチオン	バラチオンメチル	プロバクロー	
ジクロホップメチル	ピフェントリン	プロバジン	
ジクロラン	ピペロニルプトキシド	プロバニル	
ジチオビル	ピペロホス	プロバホス	
シハロホップチル	ピラゾホス	プロビコナゾール	

表2. LC-MS/MS 分析対象農薬

XMC	クローフェンビンホス	トリフルムロン	ヘキサジノン
アザコナゾール	クローフルアズロン	トリフロキシストロビン	ヘキシチアゾクス
アセタミプリド	シアナジン	ナブアニリド	ベナラキシル
アセトクロー	ジウロン	ナブロパミド	ベノキサコール
アゾキシストロビン	ジエトフェンカルブ	バクプロトラゾール	ベンコナゾール
アトラジン	ジクロプロトラゾール	ビラクロストロビン	ベンシクロン
アニコホス	ジニコナゾール	ビラクロホス	ベンゾフェナップ
アミノカルブ	ジフェナミド	ビリダリル	ベンチアバリカルブイソプロピル
アメトリン	ジフェノコナゾール	ビリプロキシフェン	ボスカリド
イソウロン	シフルフェナミド	ビリミカブ	ホスチアゼート
イソキサチオン	ジフルベンズロン	フェナミホス	ホスファミドン
イソプロカルブ	シメコナゾール	フェノキシカルブ	ミクロブタニル
イソプロチオラン	ジメタメトリン	フェノチオカルブ	メタベンズチアズロン
イプロバリカルブ	ジメトエート	フェンブカルブ	メトルカルブ
イマザメタベンズメチルエステル	ジメトモルフ	フェンアミドン	メビンホス
イミダクロプリド	スルホテップ	フェンズルホチオン	メフェナセット
エスプロカルブ	ダイアレート	フェンブコナゾール	モノクロトホス
エトキサゾール	ダイムロン	フェンプロビモルフ	モノリニユロン
エトフメセート	チアクロプリド	ブピリメート	
エトベンザニド	チアゾビル	ブプロフェジン	
エポキシコナゾール	チオベンカルブ	フラムプロップメチル	
オキサジキシル	テトラコナゾール	フラメトビル	
オキサジクローメホソ	テブコナゾール	フルシラゾール	
カズサホス	テブフェンピラド	フルトリアホール	
カルプロパミド	テフルベンズロン	フルフェノクスロン	
クミルロン	トリアジメノール	フルリドン	
クリミジン	トリアジメホソ	プレチラクロー	
クローキンセットメキシル	トリアレート	プロビザミド	
クローチオホス	トリシクラゾール	プロボキスル	
クローマゾソ	トリチコナゾール	ヘキサコナゾール	

1. 固相カートリッジカラムの探索

抽出溶液に含まれる農薬を保持することなく、食品に含まれる夾雑成分のみを保持するカラムを探索した。農薬混合標準溶液を添加したアセトニトリル溶液を抽出溶液として想定し、様々な種類および充填量の固相カートリッジカラムに1 mL ずつ合計4 mL 負荷し、溶出液に含まれる農薬濃度を1 mL ずつ確認した。さらに、同じカラムにアセトニトリルを1 mL ずつ合計2 mL 負荷し、同様に溶出液を確認した。その結果、負荷液と溶出液に含まれる農薬濃度が同じであった、すなわち農薬を保持しなかったカラムは、HLB と一部のポリマー系イオン交換カラムのみであ



った。また、農薬は、農薬を含むアセトニトリル溶液の負荷 1 mL では溶出せず、2 mL から 4 mL、およびその後のアセトニトリル 1 mL まで溶出した (図 1)。HLB 以外のカラムでは、一部農薬でカラムへの保持が確認されたことから、HLB を採用した。

2. 分析法の最適化

残留農薬分析において、オレンジは食品マトリックスの影響が大きく、分析が困難な食品に分類される。そこで、まずオレンジで分析法を確立し、他の作物へ適用した。HLB 精製への食品マトリックスの影響を確認するため、農薬の残留が認められなかったオレンジから調製した抽出溶液 (オレンジの空白抽出溶液) に農薬混合標準溶液を添加し、HLB を用いて精製した。その結果、農薬を添加したアセトニトリル溶液負荷時と同様に、農薬はカラムに保持されず、溶出するフラクションにも影響は見られなかった。

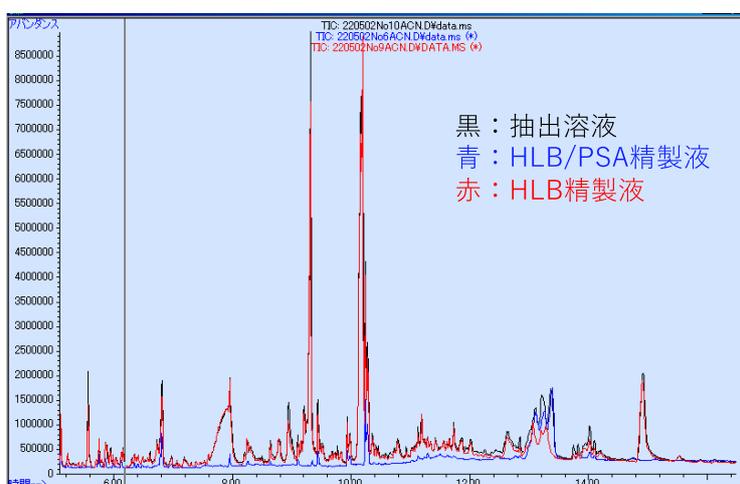


図2. TICクロマトグラムによる精製度の比較

また、GC-MS/MS 測定用試験溶液を調製する際、A/H 再溶解時に沈殿が生じた。この原因として、HLB 精製で残存した高極性物質が析出したと考えられた。そこで、PSA を用いて精製したところ、沈殿は生成せず、一方で、精製操作による農薬の回収率低下は観察されなかった。PSA での精製度を確認するため、オレンジの空白抽出溶液、HLB 精製液、HLB 精製後に PSA を追加精製

(HLB/PSA 精製) した溶液を GC/MS で SCAN 分析した。TIC クロマトグラムを比較したところ、他の 2 溶液と比較して、HLB/PSA 精製液は十分に精製されていることがわかった (図 2)。この結果から、HLB/PSA 精製を採用した。

最後に、本分析法に用いる HLB 精製のフラクションを選定した。空白抽出溶液に農薬混合標準溶液を添加し、HLB 精製を実施した。農薬を含む溶出フラクション 4 mL (図 1 参照。2 mL から 5 mL の溶出フラクションとなる。) について、溶出 1 mL ずつ、合計 4 フラクションに分けて採取し、それぞれに PSA 精製を実施して GC-MS/MS、LC-MS/MS で分析した。その結果、添加濃度に対する割合が 70%-120% の範囲 (ガイドライン²⁾ に示される真度 (%) の範囲 (ガイドラインの範囲) に含まれる項目数は、両機器とも最後の溶出フラクションが最多であった。そこで、本分析法にはこのフラクションを採用した。

3. 添加回収試験

オレンジにより最適化した分析法を用いて添加回収試験を実施し、結果を表 3 に示した。

【考察と今後の課題】

添加回収試験結果において、検討した 6 作物で、測定項目数に対する、平均回収率がガ

イドラインの範囲に収まった（合格）項目数の割合は、91-100%であった。特に、オレンジ

表3. 添加回収試験結果

作物名	測定項目数に対する		合格項目の	
	合格項目 ¹⁾ 数の割合 (%)		平均回収率 (%)	
	GC ²⁾	LC ³⁾	GC	LC
オレンジ	92	100	101	95
ほうれんそう	99	98	89	88
玄米	100	100	89	86
キャベツ	99	99	84	86
ネギ	91	100	99	96
パイナップル	100	100	82	87

¹⁾: 平均回収率が70%-120%の範囲に収まった項目

²⁾: GC-MS/MS、³⁾: LC-MS/MS

およびネギの GC-MS/MS 測定項目を除いた場合、全ての作物でその割合が 98-100%となり、ほとんどの分析対象項目が合格した。また、合格した項目について平均回収率を算出したところ、82%-101%であった。以上から、本分析法は、今回検討した 6

作物に対する残留農薬分析法として適用できる可能性が示された。

また、今回、当所での検査法から、精製に用いる固相カートリッジカラムを変更し、精製以降の工程を最適化した。その結果、本分析法に用いる抽出溶液調製後の必要溶媒量は、当所での検査法と比較して、一検体あたり 60 mL から 10 mL に減少した。加えて、操作時間は 3 時間から 1.5 時間に短縮され、目的を達成できた。

今後、残留農薬の一律基準である 10 ng/g での添加回収試験を実施する予定である。分析対象物質の濃度が低くなれば、相対的に食品マトリックス等の影響が大きくなることが予想される。また、実施日を変えて添加回収試験を実施し、分析法の室内精度を算出する。これらの情報を収集することで、本分析法について、より正確に性能を把握することができ、検査法への導入につながると考えられる。

【参考文献】

¹⁾: 高取ら、食品衛生学雑誌、54(3)、237-249(2013)

²⁾: 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の一部改正について（平成 22 年 12 月 24 日食安発 1224 第 1 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知）

【経費使途明細】

使 途	金 額
固相カートリッジカラム (Sep-Pak PSA Plus Light 130 mg/0.3 mL 4 箱、他カラム 9 箱)	338,800 円
溶媒 (アセトニトリル)	6,600 円
振込手数料	2,090 円
合 計	347,490 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円