

25. 健康危機管理体制の拡充を目的とした小麦粉中の残留農薬一斉分析方法の開発

○荒堀 康史、島 友紀、桐山 秀樹（奈良県保健研究センター）

【研究目的】

奈良県は全国的にも有名な三輪そうめんの産地であり、めん類製造業者が多く小麦粉消費量が多い県でもある。小麦は主食として喫食されるため、残留農薬の影響が大きいが、当センターでは小麦粉をはじめとする乾燥穀類の残留農薬検査に関する技術や経験の蓄積が十分でない。本研究では小麦粉中の残留農薬を迅速かつ一斉に分析する方法を開発し、当センターにおける食品安全確保および健康危機管理体制の拡充を図ることを目的とする。

【研究の必要性】

奈良県は三大そうめんの一つに挙げられる三輪そうめんの産地を有し、小麦粉消費量も全国的に上位にある。また、県内では少量ながら高品質の小麦栽培も行われている。小麦栽培には病害虫防除や収量・品質確保のため農薬が使用される。農薬は適正使用されていれば健康への影響はないが、誤った使用や意図的な混入などがあれば重大な健康被害につながる可能性がある。特に、小麦は主食として多量に喫食されるため、残留農薬のリスクは無視できない。

食に関する健康危機事象発生時は、原因食材を迅速に特定し対応することが被害拡大防止に有効である。当センターでは、野菜や果実の残留農薬検査を日常的に行っており、技術や経験の蓄積があるが、乾燥した穀類については少なくとも最近10年間は検査事例がなく、知見が不足している。そのため、小麦粉中の残留農薬について、迅速かつ一斉に分析する方法を開発することは、県民の食の安全を守り、健康危機管理体制の拡充を図る上で重要である。

【研究計画】

1. 農薬標準品を用いたUHPLC-MS/MSでの測定条件の構築

UHPLC-MS/MSは多成分の一斉分析が可能だが、そのためにはLC部分で各成分の分離条件の設定と、MS/MS部分で各成分を高感度で検出可能なプリカーサイオン及びプロダクトイオンの選定並びに測定条件の設定が必要である。農薬標準品を用いてこれらの条件を検討し、UHPLC-MS/MSによる残留農薬一斉分析の測定条件を構築する。

2. 農薬抽出条件及びクリーンアップ条件の検討

試料からの農薬の抽出には乾燥穀類や澱粉中の農薬分析で実績¹⁾のあるQuEChERS法を

ベースとした分析法を用いる。小麦粉中の農薬を効率的に抽出するためには、水による膨潤操作が必要²⁻⁶⁾との報告がある。また、多数の試料を効率的に検査するためには、分析の精度と信頼性を確保するとともに、操作性に優れた抽出法が必要となる。そこで、これらの条件を満たす水分添加量と抽出溶媒であるアセトニトリル量の検討を行う。

さらに、食品試料からの抽出液には夾雑物が多く含まれているので、抽出液をそのまま UHPLC-MS/MS で測定すると、定量精度の低下や UHPLC カラムの寿命短縮を招く可能性がある。このため、抽出液のクリーンアップを行い、操作性を損なうことなく多種類の農薬を分析可能な条件を検討する。

3. 小麦粉中の残留農薬一斉分析法の妥当性評価

構築した測定条件、抽出条件及びクリーンアップ条件での検査結果の精度及び信頼性について評価する。

4. 市場流通品中の残留農薬調査

小麦粉等の市場流通品を決定した残留農薬一斉分析方法で測定する。

【実施内容・結果】

1. 測定条件の構築

農薬標準品を用いて UHPLC の条件を検討し、表 1 に示す条件とした。さらに各農薬成分について、プリカーサイオン及びプロダクトイオンを選定し、最適な測定条件を検討した結果、MS/MS の条件を表 2、3 のように設定した。

2-1. 固相カートリッジによるクリーンアップ条件

まず、食品試料抽出液のクリーンアップでは、脱脂等低極性物質を除去する Bond Elut C18 を用い、農薬回収率を評価した。118 種類の農薬混合標準液を添加して、通過液の農薬回収率を確認した結果、14 種類の農薬で回収率 70%未満となった。次に、Bond Elut C18 では除去できなかった色素や脂肪酸等を除去するグラファイトカーボン/陰イオン交換固相カートリッジ ENVI-Carb™ II/PSA 又は ENVI-Carb/NH₂ を用い、固相カートリッジの種類及び溶出溶媒比率を農薬回収率により評価した。これらの固相カートリッジでは溶出溶媒として、アセトニトリル・トルエン混液を用い、溶出溶媒の混合割合を変えて 118 種類の農薬混合標準液で農薬回収試験を行った。固相カートリッジ単独での農薬回収率と、Bond Elut C18 カートリッジと組み合わせた農薬回収率が所定の範囲となった農薬数を表 4 に示す。表に示すように、グラファイトカーボン/陰イオン交換固相カートリッジ単独では、ENVI-Carb™ II/PSA と ENVI-Carb/NH₂ ともに溶出溶媒の組成がアセトニトリル:トルエン比が 8:0 では回収率 70~120%を満たす農薬数は 60 種類前後だが、トルエンを混合すると約 100 種類に増加した。溶出溶媒のアセトニトリル:トルエン比が 6:2 から 4:4 の間では、回収率 70~120%を満たす農薬数はほぼ一定だが、6:2 よりトルエンの割合が高くなると、ロータリーエバポレーターでの濃縮が困難となるため、操作性を考慮して溶出溶媒のアセトニトリル:トルエン比は 3:1 (= 6:2) とした。さらに ENVI-Carb™ II /PSA と

表1 UHPLC 条件

LC system	SHIMADZU NEXERA XS
カラム	YMC Triart C18 100×2.1 mm ID 1.9 μm
移動相	A:5 mM ammonium acetate in water B:5 mM ammonium acetate in methanol
移動相グラジェント(B Conc.)	5%(0min)→5%(0.1min)→50%(1.0min) →58%(5.0min)→75%(10.0min)→90%(13.0min) →95%(14.0min)→95%(18.0min)→5%(18.1min)
流速	0.2 mL/min
カラム温度	40 °C
注入量	1 μL

表2 MS 条件

MS system	SCIEX QTRAP4500
イオン化方式	ESI±
IonSpray 電圧	5500 (positive) -4500 (negative)
イオンソース Gas1	50 psi
イオンソース Gas2	60 psi
Gas2 温度	350 °C
Curtain Gas	4 psi
Collision Gas	9 psi

表3 リテンションタイムと MRM 条件

Ionization	定量イオン		確認イオン		Retention Time	
	Precursor	Fragment	Precursor	Fragment		
3-Hydroxycarbofuran	ESI+	238	163	238	181	4.33
Abamectin B1a	ESI+	890	305	890	567	16.08
Acibenzolar-S-methyl	ESI+	211	136	211	140	11.40
Aldicarb	ESI+	208	116	208	89	5.66
Aldoxycarb	ESI+	240	148	240	86	3.27
Ametryn	ESI+	228	186	228	96	10.96
Amitraz	ESI+	294	163	294	122	16.12
Anilofos	ESI+	368	125	368	199	13.25
Azamethiphos	ESI+	325	183	325	139	6.42
Azinphos-methyl	ESI+	318	132	318	160	10.29
Azoxystrobin	ESI+	404	372	404	344	10.65
Barban	ESI+	258	178	258	143	11.73
Benalaxyl	ESI+	326	148	326	294	13.38
Bendiocarb	ESI+	224	109	224	167	6.97
Benfuracarb	ESI+	411	195	411	252	14.64
Benzofenap	ESI+	431	105	431	119	14.62
Bosalid	ESI+	343	307	343	140	11.02
Bromacil	ESI+	261	205	261	188	7.04
Buta fena cil	ESI+	492	180	492	331	12.02
Carbaryl	ESI+	202	145	202	127	7.76
Carbetamide	ESI+	237	118	237	192	6.21
Carbofuran	ESI+	222	165	222	123	6.98
Carbosulfan	ESI+	381	118	381	160	16.50
Carfentrazone-ethyl	ESI+	412	346	412	366	13.11
Carpropamid	ESI+	336	139	336	103	13.42
Chlorbufam	ESI+	224	172	224	154	10.93
Chlorfluazuron	ESI+	540	383	540	158	15.85
Chloridazon	ESI+	222	92	222	104	4.69
Chloroxuron	ESI+	291	72	291	218	11.86
Chromafenozide	ESI+	395	175	395	147	12.19
Clodinafop-propargyl	ESI+	350	266	350	91	13.16
Clofentezine	ESI+	303	102	303	138	14.26
Cloquintocet-mexyl	ESI+	336	192	336	238	15.04
Clothianidin	ESI+	250	169	250	132	4.11
Cumyluron	ESI+	303	185	303	125	11.78
Cyazofamid	ESI+	325	108	325	261	12.51
Cycloate	ESI+	216	154	216	154	14.21
Cycloprothrin	ESI+	499	181	499	229	15.71
Cyflufenamid	ESI+	413	295	413	241	13.80
Cymoxanil	ESI+	199	128	199	111	4.89
Cyprodinil	ESI+	226	93	226	108	13.60
Daimuron	ESI+	269	151	269	91	11.60
Diflubenzuron	ESI+	311	158	311	141	12.79
Dimethirimol	ESI+	210	140	210	71	8.43
(E)-Dimethomorph	ESI+	388	301	388	165	10.72
(Z)-Dimethomorph	ESI+	388	301	388	165	11.27
Diuron	ESI+	233	72	233	160	9.47
Epoxiconazole	ESI+	330	121	330	101	12.39
Etoxaazole	ESI+	360	141	360	304	15.61
Fenamidone	ESI+	312	92	312	65	10.89
Fenoxaprop-ethyl	ESI+	362	288	362	121	14.68
Fenoxycarb	ESI+	302	88	302	116	12.93
Fenpropimorph	ESI+	304	147	304	117	16.81
(E)-Fenpyroximate	ESI+	422	366	422	107	15.21
(Z)-Fenpyroximate	ESI+	422	366	422	107	15.90
(E)-Fermzone	ESI+	255	124	255	132	11.06
(Z)-Fermzone	ESI+	255	124	255	132	11.23
Flamprop-methyl	ESI+	336	105	336	77	11.63
Fluazuron	ESI+	506	141	506	158	15.30

Ionization	定量イオン		確認イオン		Retention Time	
	Precursor	Fragment	Precursor	Fragment		
Flufenacet	ESI+	364	152	364	194	12.19
Flufenoxuron	ESI+	489	158	489	141	15.48
Fluridone	ESI+	330	310	330	259	10.44
Furametpyr	ESI+	334	157	334	290	8.70
Furathiocarb	ESI+	383	195	383	252	14.78
Hexaflumuron	ESI+	461	158	461	141	14.47
Hexythiazox	ESI+	353	228	353	168	15.36
Imazalil	ESI+	297	159	297	109	13.18
Imidaclorprid	ESI+	256	175	256	209	3.94
Indanofan	ESI+	341	175	341	187	12.58
Inodoxcarb	ESI+	528	203	528	56	14.16
Iprovalicarb	ESI+	321	119	321	203	12.05
Isoxaflutole	ESI+	377	251	360	144	9.24
Linuron	ESI+	249	160	249	182	10.83
Lufenuron	ESI+	511	158	511	141	15.19
Mefenpyr-diethyl	ESI+	373	327	373	160	13.60
Mepanipyrim	ESI+	224	106	224	77	12.51
Methabenzthiazuron	ESI+	222	165	222	150	9.03
Methiocarb	ESI+	226	121	226	169	10.88
Methomyl	ESI+	163	88	163	106	3.58
Methoxyfenoxide	ESI+	369	149	369	313	11.63
Monolinuron	ESI+	215	126	215	99	8.27
Naproanilide	ESI+	292	171	292	120	12.91
Novaluron	ESI+	493	158	510	158	14.47
Oxabetrinil	ESI+	233	147	233	87	10.75
Oxamyl	ESI+	237	72	237	90	3.31
Oxa zidemofone	ESI+	376	190	376	161	14.68
Oxycarboxin	ESI+	268	175	268	147	4.81
Pencycuron	ESI+	329	125	329	89	13.99
Pentoza zone	ESI+	354	286	354	186	14.80
Phoxim	ESI+	299	129	299	77	13.92
Pirimicarb	ESI+	239	72	239	182	8.58
Prometryn	ESI+	242	158	242	200	12.39
Propagrazafop	ESI+	444	100	444	163	14.95
Pymetrozene	ESI+	218	105	218	78	3.42
Pyraclostrobin	ESI+	388	194	388	163	13.82
Pyrazolynate	ESI+	439	173	439	155	13.98
Pyrazophos	ESI+	374	222	374	194	14.05
Pyrifotalid	ESI+	319	139	319	179	10.46
Primingethanil	ESI+	200	107	200	168	11.11
Quinalop-ethyl	ESI+	373	299	373	271	14.75
Silafluofen	ESI+	426	287	426	168	18.18
Simeconazole	ESI+	294	70	294	135	11.98
Spinosyn A	ESI+	732	142	732	98	16.63
Spinosyn D	ESI+	746	142	746	98	17.06
Tebufenozide	ESI+	353	297	353	133	12.80
Tebuthiuron	ESI+	229	172	229	116	7.22
Teflubenzuron	ESI+	381	141	381	158	15.11
Tetrachlorvinphos	ESI+	367	127	369	127	12.90
Thia benda zole	ESI+	202	131	202	175	6.45
Thia cloprid	ESI+	253	126	253	99	4.83
Thia metoxam	ESI+	292	211	292	181	3.53
Thiodicarb	ESI+	355	88	355	108	8.27
Trifl oxystrobin	ESI+	409	186	409	206	14.34
Triflumizole	ESI+	346	278	346	73	14.35
Triflumizole metabolito	ESI+	295	278	295	215	12.06
Triflumuron	ESI+	359	156	359	139	13.74
Triticonazole	ESI+	318	70	318	125	12.03
Oryzalin	ESI-	345	281	345	78	12.20

ENVI-Carb/NH₂を比較すると、Bond Elut C18との組み合わせで回収率70~120%を満たす農薬数はほぼ同じであったが、基準を厳しくして回収率80%以上とすると、ENVI-Carb™ II/PSAの方が基準を満たす農薬数が多かったため、ENVI-Carb™ II/PSAを採用した。

表4 グラファイトカーボン/陰イオン交換固相カートリッジでの溶出溶媒組成と所定の回収率を満たした農薬数

Acetonitrile : Toluene		8 : 0	7 : 1	6 : 2	5 : 3	4 : 4
ENVI-Carb™ II /PSA	回収率 70~120%	61	98	109	108	111
Bond Elut C18+ENVI-Carb™ II /PSA	回収率 70~120%	42	70	87	86	88
Bond Elut C18+ENVI-Carb™ II /PSA	回収率 80~120%	7	6	47	19	42
ENVI-Carb/NH ₂	回収率 70~120%	58	103	112	113	114
Bond Elut C18+ENVI-Carb/NH ₂	回収率 70~120%	47	86	89	91	91
Bond Elut C18+ENVI-Carb/NH ₂	回収率 80~120%	3	48	20	33	17

表5 アセトニトリル及び水の添加量と回収率70~120%を満たした農薬数

水添加量[mL]	0	2	4	6	8	10	10※
アセトニトリル添加量10 mL	-	-	106	107	101	105	103
アセトニトリル添加量15 mL	89	-	106	108	104	104	105
アセトニトリル添加量20 mL	85	109	108	109	105	107	105

10※は水10 mL添加後15分静置してアセトニトリルを添加した

2-2. 農薬抽出条件

農薬抽出条件の検討として、試料への水添加量と抽出用のアセトニトリル量を段階的に変えて、農薬抽出効率を評価した。小麦粉試料 5g に 118 種類の農薬混合標準液を添加後、水添加量を 0~10mL まで 2mL 刻みで 6 段階、抽出に用いるアセトニトリル量を 10、15、20mL の 3 段階に変化させて抽出液を調製した。回収率 70~120%を満たす農薬数を表 5 に示す。水添加量については、データを得ることが出来た範囲では 0mL 以外は回収率 70~120%を満たす農薬数はほぼ同数であった。アセトニトリル量についても、3 段階に変化させたが回収率 70~120%を満たす農薬数に差はなかった。以上の結果から、水添加量は通知法⁶⁾を参考に試料量の 2 倍に相当する 10mL、アセトニトリル量は最も少ない 10mL とする。図に試料からの抽出及びクリーンアップの処理フローを示す。

3. 小麦粉中の残留農薬一斉分析法の妥当性評価

市場流通品の調査を行うにあたり、分析方法の妥当性評価を実施した。厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知⁷⁾「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」に基づき、小麦粉に 118 種類農薬混合標準液を添加して妥当性評価を実施した。添加濃度は低濃度 0.01 mg/kg、高濃度 0.05 mg/kg の 2 濃度で、実施者 1 名が 1 日 2 併行で 5 日間残留農薬検査を実施した。その結果、小麦粉試料では 105 種類の農薬が妥当性評価の基準を満たした。

4. 市場流通品中の残留農薬調査

妥当性評価の基準を満たした農薬について、市場流通品の小麦粉を対象に残留農薬調査を実施した。小麦粉は薄力粉 3 銘柄、強力粉 1 銘柄を用いた。さらに、粉末穀類として上新粉、もち粉、そば粉、きな粉、はつたい粉。外観が類似する試料として、片栗粉及びコーンスターを調査対象とした。調査の結果、対象とした全ての試料において、妥当性評価の基準を満たした農薬は全て 0.01mg/kg 未満であり、残留農薬は検出されなかった。

【考察と今後の課題】

小麦中の残留農薬検査について、LC-MS/MSを用いた105種類の農薬の一斉分析法を構築することができた。今後は、GC-MS/MSによる測定の追加を検討し、測定可能な農薬を増やすとともに、市場流通品の調査も継続的に実施することで、食品の安全を確認するとともに健康危機管理体制の強化を図る。

【参考文献】

- 1) 小鍛治好恵、富澤早苗、上條恭子、他:食衛誌、64、246-252 (2023)
- 2) 岡部亮、柿本洋一郎、青柳光敏:北海道立衛生研究所報、69、47-50 (2019)
- 3) 山口玲子:千葉市環境保健研究所年報、22、63-66(2015)
- 4) 山口玲子:千葉市環境保健研究所年報、28、74-78(2021)
- 5) 永山敏廣、真木俊夫、観公子、他:食衛誌、30、438-443(1989)
- 6) 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0124001号 (平成29年6月20日一部改正)
- 7) 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22年12月24日一部改正)

【経費使途明細】

① 試薬購入費(抽出・精製用有機溶剤、農薬標準品)	50,226 円
② 精製用固相カートリッジ購入費	207,570 円
③ 分析用器具・消耗品購入費(バイアル瓶・キャップ等)	39,560 円
④ 流通食品購入費	2,750 円
利息	-106 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円

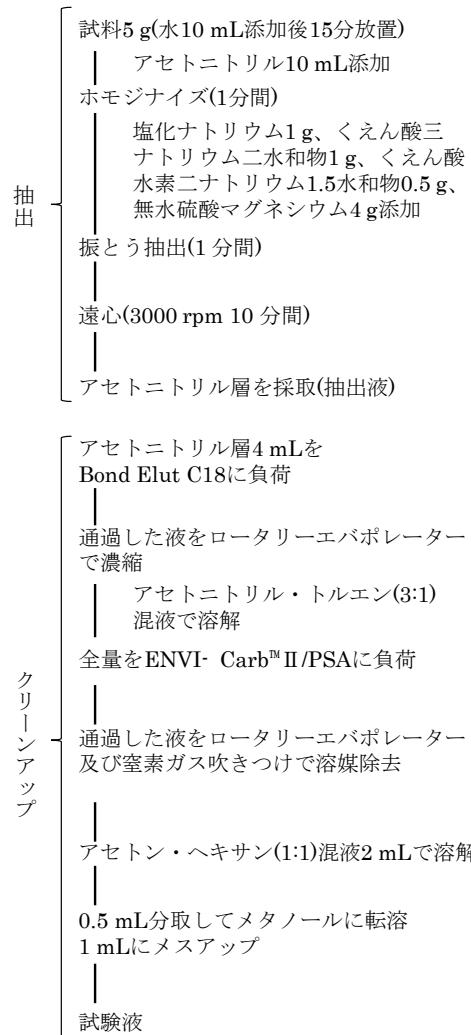


図 試料からの抽出及びクリーンアップの処理フロー