

表 1 オキシクロルデンの各 MS/MS 条件におけるピーク高さ及び S/N 比

Precursor ion (amu)	Product ion (amu)	CE (eV)	Peak height (counts, n=3)			Noise (counts, n=3)		S/N ratio (n=3)		
			Mean	RSD	Order	Mean	RSD	Mean	RSD	Order
388.8	388.8	-5	25600000	6	24	424	34	60425	6	16
	352.8	-5	4693333	13	53	376	21	12493	13	41
	324.8	-8	8233333	13	48	330	26	24975	13	37
	317.8	-10	6593333	2	50	223	1	29611	2	34
	315.8	-10	6660000	18	49	277	1	24014	18	38
	288.8	-15	13166667	12	41	372	34	35426	12	33
	286.8	-15	10406667	12	45	278	1	37479	12	30
	264.8	-15	15800000	15	35	371	34	42626	15	26
	262.8	-10	14766667	8	37	208	43	70908	8	13
	254.8	-25	6530000	13	51	371	35	17601	13	39
252.8	-35	17533333	8	34	364	22	48168	8	24	
386.8	386.7	-5	26733333	1	23	530	20	50472	1	23
	350.7	-8	11533333	2	42	282	1	40898	2	27
	322.8	-10	14233333	3	39	278	1	51199	3	22
	315.8	-10	9580000	18	47	370	22	25892	18	36
	286.8	-13	13833333	17	40	297	44	46525	17	25
	284.8	-12	6293333	18	52	370	22	16994	18	40
	262.8	-13	23100000	13	27	408	16	56595	13	19
	260.8	-10	10336667	20	46	277	1	37272	20	32
	252.8	-32	19133333	17	33	370	69	51712	17	21
	250.8	-30	15400000	5	36	232	35	66499	5	15
238.9	238.8	-15	55533333	3	15	170978	9	325	3	46
	203.8	-15	24500000	3	26	273	1	89744	3	9
	144.7	-20	11033333	2	44	389	24	28339	2	35
	142.7	-20	21800000	6	30	365	22	59712	6	18
	120.7	-25	11133333	9	43	298	44	37412	9	31
	118.7	-20	21833333	2	29	364	21	59982	2	17
236.8	236.8	-10	131000000	2	7	270853	4	484	2	44
	166.8	-30	14633333	21	38	364	11	40201	21	29
	142.7	-25	35566667	9	21	408	41	87280	9	10
	140.8	-20	24800000	2	25	318	24	77987	2	12
	118.7	-25	31100000	9	22	371	34	83903	9	11
	116.7	-25	21166667	11	31	318	24	66562	11	14
186.9	186.8	-5	68100000	4	14	661315	12	103	4	52
	158.8	-10	36800000	4	20	282978	17	130	4	50
	150.8	-8	99700000	3	10	445	1	223877	3	5
	148.8	-5	37133333	9	19	278	50	133573	9	7
	122.8	-10	131666667	7	6	445	1	295659	7	3
	120.8	-10	70133333	15	13	445	50	157603	15	6
	118.7	-30	20400000	5	32	500	56	40827	5	28
	86.8	-25	42166667	10	17	445	50	94828	10	8
	84.8	-23	87600000	3	11	364	22	240439	3	4
184.9	184.8	-10	49966667	8	16	838929	7	60	8	53
	156.8	-10	42133333	10	18	314462	16	134	10	49
	148.8	-5	108000000	9	9	171586	54	629	9	43
	120.8	-15	262666667	2	2	521	25	504159	2	1
	116.7	-20	223666667	3	28	409	33	54664	3	20
	84.8	-25	134666667	4	5	319	26	422153	4	2
116.9	116.8	-10	242333333	5	3	1550583	31	156	5	48
	88.9	-13	78900000	7	12	712753	2	111	7	51
114.9	114.9	-10	543333333	4	1	2333083	1	233	4	47
	86.9	-20	139333333	4	4	324186	21	430	4	45
	51.0	-20	114333333	4	8	20521	170	5572	4	42

CE: collision energy.

表 2 オキシクロルデンの MS/MS 条件検討結果

(A) S/N 比で並べ替えた場合

Precursor ion (amu)	Product ion (amu)	CE (eV)	Order	
			S/N ratio	Peak height
184.9	120.8	-15	1	2
184.9	84.8	-25	2	5
186.9	122.8	-10	3	6
186.9	84.8	-23	4	11
186.9	150.8	-8	5	10
186.9	120.8	-10	6	13
186.9	148.8	-5	7	19
186.9	86.8	-25	8	17
238.9	203.8	-15	9	26
236.8	142.7	-25	10	21

CE: collision energy.

(B) ピーク高さで並べ替えた場合

Precursor ion (amu)	Product ion (amu)	CE (eV)	Order	
			Peak height	S/N ratio
114.9	114.9	-10	1	47
184.9	120.8	-15	2	1
116.9	116.8	-10	3	48
114.9	86.9	-20	4	45
184.9	84.8	-25	5	2
186.9	122.8	-10	6	3
236.8	236.8	-10	7	44
114.9	51.0	-20	8	42
184.9	148.8	-5	9	43
186.9	150.8	-8	10	5

CE: collision energy.

II. 分担研究報告書

2. 畜水産食品中残留農薬及び動物用医薬品の包括的分析法の開発

分担研究者 坂井隆敏

畜水産食品中残留農薬及び動物用医薬品の包括的分析法の開発

分担研究者 坂井 隆敏 国立医薬品食品衛生研究所研究員

研究要旨

検査機関におけるより効率的な検査体制の確立を目的として、畜水産食品に基準が設定されている農薬及び動物用医薬品（農薬等）の包括的一斉分析法を開発する。

平成20年度は、昨年度（平成19年度）に行った既存の通知一斉試験法「LC/MSによる農薬等の一斉試験法（畜水産物）」及び「HPLCによる動物用医薬品の一斉試験法Ⅰ（畜水産物）」の抽出操作によって得られた結果を基に、様々な食品から広範囲のlog Pow値を有する農薬及び動物用医薬品を抽出し得る抽出方法の構築を検討する。

坂井隆敏・国立医薬品食品衛生研究所
研究員

A. 研究目的

平成18年5月29日、食品に残留する農薬、飼料添加物及び動物用医薬品（農薬等）に関するいわゆるポジティブリスト制度が施行された。本制度の導入に伴い、農薬、動物用医薬品それぞれに対する一斉試験法の研究・開発がなされ、今日までに農薬について5種類、動物用医薬品について3種類の一斉試験法が通知されている。現在各検査機関においては、これら通知試験法に準拠した分析法を用いて食品中の残留農薬等の検査が実施されている。これら通知試験法は、いずれも農薬もしくは動物用医薬品どちらか一方のみを測定する試験法であり、農薬試験法で動物用医薬品が測定できるか、また動物用医薬品試験法で農薬が測定できるかについては、ほとんど検討がなされていない。

一方、動物用医薬品はもとより、農薬の中にも畜水産食品に基準値が設定されているものがあるため（約300農薬）、畜水産食品については農薬・動物用医薬品の両方を測定しなければならぬ。しかしながら、上述のように現在用いられている一斉試験法は農薬もしくは動物用医薬品のどちらか一方しか測定する事ができず、畜水産食品を検査する場合、現状では農薬試験法と動物用医薬品試験法を用いて2度の検査を行う必要がある。

農薬と動物用医薬品は、使用対象や使用方法などの点においては異なるものの、人の健康を損なうおそれがある化学物質とい

う点においては同様であり、食品マトリックスが同じであれば、基本的には同様の分析法で測定する事が可能であると考えられる。農薬及び動物用医薬品両薬を一度に測定できる分析法が開発されれば、現在それぞれの試験法で2度行われている検査を1度に短縮できる為、より効率的な食品の検査が可能になると考えられる。

本研究では、検査機関におけるより効率的な検査体制の確立を目的として、畜水産食品に基準値が設定されている農薬等を対象として、これらの包括的一斉分析法の開発を試みる。

B. 研究方法

昨年度（平成19年度）は、農薬試験法及び動物用医薬品試験法による農薬等の抽出に関する基礎的データの収集を行った。

すなわち、水/オクタノール分配係数対数値（log Pow値）を参考にして選択した農薬29種類、動物薬25種類、農薬且つ動物薬として使用される薬品（農薬/動物薬）18種類を対象として、既存の通知一斉試験法

「LC/MSによる農薬等の一斉試験法（畜水産物）」及び「HPLCによる動物用医薬品の一斉試験法Ⅰ（畜水産物）」の抽出操作を行い、牛の筋肉及び肝臓試料からの回収率（%）を求めた。

その結果、農薬試験法においては、log Pow値1.0以上の農薬及び農薬/動物薬については比較的良好な抽出が可能であったが、動物薬に関してはlog Pow値に関わらず低い回収率であり、多くが水層に移行しているものと推察された。一方、試料に関しては、筋肉試料及び肝臓試料で得られた回収率に大きな差は認められなかったことから、幅広い食品に適用可能であることが示唆された。

また、動物薬試験法においては、筋肉試

料の場合は農薬等及びそれらのlog Pow値に関わらず良好な回収率(%)が得られた。しかしながら、肝臓試料において回収率が低下する傾向が認められたことから、食品によっては農薬等を効率的に抽出できない可能性があるかと推察された。

以上のような結果から、本年度(平成20年度)は、農薬試験法及び動物薬試験法の抽出操作の改良を試みた。

実際の操作について以下に示した。

農薬試験法改法：試料20.0 gを採り、水20 mLを加えてホモジナイズした後、アセトン及びn-ヘキサン(1:2)混液100 mLを加えて更にホモジナイズ後、毎分2500回転で5分間遠心分離を行った。有機層を採り、残留物及び水層(下層)にn-ヘキサン50 mLを加えてホモジナイズ後、遠心分離を行った。得られた有機層を合わせ、40℃以下で減圧乾固した。遠心分離後の残留物及び水層にアセトニトリル40 mLを加えて振とう及び遠心分離を行い、水/アセトニトリル層を有機層を減圧乾固して得られた残留物に加え、更にn-ヘキサン40 mLを加えて激しく振とうした。遠心分離後の残留物に30%含水アセトニトリル100 mLを加えて振とう及び遠心分離を行い、得られた水/アセトニトリル層を先のヘキサン分配で得られたヘキサン層と合わせ、激しく振とうした。静置後、得られた水/アセトニトリル層を、先のヘキサン分配で得られた水/アセトニトリル層と合わせ、これに塩化ナトリウム40 gを加えて激しく振とうした。静置後、アセトニトリル層を採り、40℃以下で減圧乾固を行い、得られた残留物をアセトニトリル及び水(6:4)混液4.0 mLに溶かし、これを試験溶液とした。

動物薬試験法改法：試料5.0 gを採り、30%含水アセトニトリル30 mL、アセトニトリル飽和n-ヘキサン20 mLを加えてホモジナイズした後、毎分3000回転で5分間遠心分離を行った。水/アセトニトリル層を採り、n-ヘキサン層及び残留物に30%含水アセトニトリル20 mLを加えて激しく振とうした後、遠心分離を行った。水/アセトニトリル層を採り、先に得られた水/アセトニトリル層を合わせ、n-プロパノール10 mLを加えて40℃以下で減圧乾固した。残留物にアセトニトリル及び水(6:4)混液1.0 mLを加えて溶かし、これを試験溶液とした。

両法において得られた試験溶液10 µLを高速液体クロマトグラフィー/質量分析(LC-MS)に供し、得られたピーク面積から各農薬等の回収率(%)を求めた。なお、両試験法はほとんど抽出操作のみであり、絶対検量線法による定量においては、試料

のマトリックス効果によって正確な定量値が求められない場合もあることから、標準添加法及びマトリックス検量線法を用いて定量を行い、回収率(%)を算出した。

本研究で用いた測定機器及び測定条件について以下に示した。

・高速液体クロマトグラフ(Alliance 269 5, Waters製)

分析カラム: Mightysil RP-18 GP (150×3 mm, 3 µm, 関東化学株式会社製)

カラム温度: 40℃

移動相: 0.1%ギ酸(A)及びアセトニトリル(B)

グラジエント条件(t: 時間(分)): t₀, B=1%; t₅, B=2%; t₁₀, B=5%; t₁₅, B=10%; t₂₀, B=25%; t₂₅, B=45%; t₃₀, B=70%; t₃₅, B=100%; t₄₀, B=100%; t_{40.1}, B=1%; t₅₀, B=1%

流速: 0.4 mL/min

注入量: 10 µL

・質量分析計(Micromass ZQ 2000, Waters製)

ソース温度: 100℃

脱溶媒温度: 350℃

窒素ガス流量: 700 L/hr

キャピラリー電圧: 3.5 kV (ポジティブイオンモード), 3.0 kV (ネガティブイオンモード)

イオン化法: エレクトロスプレーイオン化法

なお、倫理面への配慮については、人及び動物を用いた実験は含まれていない為、特に倫理面への配慮は必要としない。

C. 研究結果

・農薬試験法

平成19年度に行った農薬試験法においては、筋肉試料及び肝臓試料で得られた回収率に大きな差は認められなかったことから、幅広い食品に適用可能であることが示唆され、また、log Pow値1.0以上の農薬及び農薬/動物薬については比較的良好的な抽出が可能であったものの、動物薬に関してはlog Pow値に関わらず低い回収率であった(図1及び2)。

したがって、本年度(平成20年度)は、水層に移行していることが推察されるlog Pow値1.0以下の農薬及び農薬/動物薬、並びに動物薬全般の回収率改善を目的として、これら農薬等を水層から抽出する方法について検討を行った。前述の農薬試験法改法を用いた肝臓試料からの農薬等の回収結果を図3に示した。

前年度の農薬試験法において得られた結果(肝臓試料、図2)と比較すると、検討対象農薬等全般において回収率が向上して

いることが解かる。肝臓試料における回収率の中央値を求めたところ、前年度の農薬試験法においては、農薬：65%、動物薬：4%、農薬/動物薬：54%、全農薬等：21%であったものが、本年度の農薬試験法改法においては、農薬：78%、動物薬：81%、農薬/動物薬：84%、全農薬等：79%となり、回収率が改善されていることが明らかとなった（表2）。

以上得られた結果から、本改法のようにまずアセトン/ヘキサン混液を用いて低～中極性農薬等を抽出し、更に残留物及び水層から中～高極性農薬等を抽出することにより、幅広い農薬等を抽出することが可能であることが示唆された。

・動物薬試験法

動物薬試験法においては、筋肉試料の場合には農薬等及びそれらのlog Pow値に関わらず良好な回収率（%）が得られたが、肝臓試料において回収率が低下する傾向が認められたことから（図4及び5）、食品によっては農薬等を効率的に抽出できない可能性があると推察された。

そこで、アセトニトリルよりも試料と混和し易いと考えられる含水アセトニトリルを用いて抽出を試みた。その結果、図6に示したとおり、検討対象農薬等全般において若干の回収率の向上が確認された。肝臓における回収率の中央値についても、動物薬試験法においては、農薬：62%、動物薬：72%、農薬/動物薬：75%、全農薬等：72%であったものが、動物薬試験法改法においては、農薬：86%、動物薬：77%、農薬/動物薬：78%、全農薬等：80%となり、若干ではあるが回収率の改善が認められた（表2）。

D. 考察

「C. 研究結果」において述べたように、本年度検討を行った農薬試験法改法及び動物薬試験法改法を用いることにより、肝臓試料から幅広い極性を有する農薬等を抽出することが可能であることが明らかとなった。

農薬試験法改法は、脂肪等を溶解可能なアセトン/ヘキサン混液を用いて低～中極性の農薬等を脂肪等と共に抽出した後、水層に移した中～高極性農薬等を抽出する方法である。したがって、脂肪含量の高い食品や水分含量の高い食品など、様々な食品に対して適用可能であると推察される。本検討においては、エリスロマイシン、ラフォキサニド及びエマメクチンなどの分子量の大きな農薬等を検討対象に加えているが、これらの農薬等はゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）では脂肪等と分離するこ

とができない。よって、本検討におけるアセトン/ヘキサン層の脱脂は、アセトニトリル/ヘキサン分配のみで行っている。しかしながら、分子量の小さな農薬等については、既存の通知試験法通りにGPC及びミニカラムを用いた脱脂精製を行い、分子量の大きな農薬等についてのみアセトニトリル/ヘキサン分配を行うことで、減圧乾固の過程において生じる農薬等の揮散による回収率の低下を抑えることが可能であり、また、より高い脱脂精製効果が得られることが期待される。

また、水層からの中～高極性農薬等の抽出は、本検討では塩析により水層中の農薬等をアセトニトリル層に移行させることにより行っているが、実際の水層（下層）はアセトンが混和して「水/アセトン層」となっているため、減圧濃縮等によりアセトンを除去した後塩析を行うことで、更に効率的に農薬等をアセトニトリル層に移行させることが可能であると考えられる。また、塩析操作ではなく、ミニカラム等を用いることにより水層（水/アセトン層）から農薬等を抽出することが可能であれば、抽出と同時に高い精製効果が得られることが期待される。

一方、動物薬試験法改法についても、脂肪等を溶解可能なヘキサンと低～高極性農薬等を抽出することが可能であると考えられる含水アセトニトリルを用いた方法であるため、様々な食品から幅広い農薬等を抽出することが可能であると考えられ、また、回収率についても農薬試験法改法と同等の結果が得られた。動物薬試験法ではアセトニトリル/ヘキサンを用いて抽出を行っているのに対し、本改法においては含水アセトニトリル/ヘキサンを用いて抽出を行っているため、農薬等の抽出液の極性が高くなっている。したがって、本報における検討対象農薬等においては確認されなかったが、低極性農薬等の一部はよりヘキサン層に移行し易くなっていることが推察される。加えて、水分含量が高い食品等においては、食品中の水分が水/アセトニトリル層に加わり、水/アセトニトリル層の極性が更に高くなることにより、低極性農薬等が更にヘキサン層に移行し易くなることが予想される。既存の通知試験法及び本改法においては、分配後のヘキサン層は廃棄するため、このように農薬等がヘキサン層に移行することは回収率の低下や測定値のバラツキの原因となる。回収率の低下や測定値のバラツキを抑えるためには、GPC等を用いてヘキサン層中から農薬等を再度抽出する操作を追加する必要がある。このように、動物薬試験法改法にヘキサン層からの

農薬等の抽出操作を加えた場合、抽出の原理や操作・方法等は農薬試験法改法とほとんど同様のものとなる。

よって、本報における抽出法としては、既存の通知試験法として検査機関において実際に用いられており、多くの実績のある農薬試験法をベースとして、水層に移行した中～高極性農薬等の抽出方法を追加したものを採用することとした。

本報において検討した農薬試験法改法を用いることにより、種々の食品から幅広い農薬等を抽出することが可能であると考えられる。次年度は、本年度に選択した抽出法に、アセトン/ヘキサン層についてはGPC及びミニカラム、並びにアセトニトリル/ヘキサン分配を併用した脱脂操作を追加し、また、水層については逆相系のミニカラムを用いた精製を追加することにより最終的な試験法を確立する。加えて、対象食品及び対象農薬等を追加し、試験法の適用性について検討する。

E. 結論

畜水産食品に残留する農薬及び動物用医薬品の包括的一斉分析法の開発を目的として、幅広い農薬等を抽出可能な抽出方法について検討を行った。既存の通知試験法である農薬試験法をベースとして、まずアセトン/ヘキサン混液を用いて低～中極性農薬等を脂肪等と共に抽出後、水層から中～高極性農薬等を抽出することにより、また、既存の動物薬試験法をベースとして、含水アセトニトリル/ヘキサンを用いて抽出を行うことにより、広範囲の農薬等を抽出することが可能であることが明らかとなった。検査機関などにおける使用実績等を考慮して、抽出法としては農薬試験法をベースとした改法を選択し、以降精製法の追加や対象食品及び対象農薬等の追加を行い、最終的な一斉分析法の開発を図る。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1 各検討農薬等のlog Pow値、保持時間、分子量 (MW)、測定イオン (m/z) 及びイオン化モード

動物薬	log Pow	保持時間 (min)	MW	m/z	イオン化モード	農薬	log Pow	保持時間 (min)	MW	m/z	イオン化モード
セフロキシム	-0.16	24.4	424.4	423.0	negative	アシェナム	-0.27	13.4	230.2	229.0	negative
スルファジアジン	-0.09	14.6	250.3	251.0	positive	チアメトキサム	-0.13	22.1	291.7	291.9	positive
スルファチアゾール	0.05	17.6	255.3	255.9	positive	イミダクロプリド	0.57	24.3	255.7	255.9	positive
ジニトルミド	0.19	24.2	225.2	225.9	positive	アセタミプリド	0.80	25.2	222.7	222.9	positive
スルファドキシム	0.35	18.3	249.3	249.9	positive	アルジカルブ	1.13	26.9	190.3	157.0	positive
セファレキシン	0.65	20.3	347.4	347.9	positive	トリフルニゾール	1.40	35.1	345.8	345.9	positive
ジフロキサシン	0.89	22.7	399.4	400.0	positive	ピリミカルブ	1.70	23.2	238.3	239.0	positive
サラフロキサシン	1.07	22.6	385.4	386.0	positive	ヘキサジニン	1.85	27.2	252.3	253.0	positive
スルファベンズアミド	1.30	26.3	276.3	277.0	positive	ブトロキシジム	1.90	36.9	399.5	400.1	positive
デキサメタゾン	1.83	28.6	392.5	393.0	positive	シマジン	2.18	27.8	201.7	202.0	positive
エトバベート	1.90	26.7	237.3	237.9	positive	イソキサフルトール	2.32	32.4	359.3	359.9	positive
フェノキシメチルベニシリン	2.09	29.3	350.4	351.0	positive	グリニスルフロニメチル	2.41	32.8	468.3	468.8	positive
スルファニトラン	2.26	28.8	335.3	336.0	positive	イマザピクタアンモニウム	2.47	24.7	275.3	276.0	positive
ブラジクアンテル	2.42	30.9	312.4	313.1	positive	エトキシスルフロニ	2.89	32.4	398.4	398.9	positive
クロピドール	2.71	16.7	192.0	191.9	positive	アメトリン	2.98	27.6	227.3	228.0	positive
エリスロマイシン	3.06	26.0	713.9	714.5	positive	フルフェナセット	3.20	33.9	363.3	363.9	positive
メシリナム	3.09	22.0	325.4	326.0	positive	フラムフロップメチル	3.33	33.3	335.8	335.9	positive
メロキシカム	3.43	31.2	351.4	351.9	positive	パーバン	3.41	33.2	258.1	257.9	positive
カラゾール	3.59	24.0	298.4	299.1	positive	プロメトリン	3.51	29.6	241.4	242.0	positive
ホシラジン	4.52	21.9	220.3	221.0	positive	メトキシフェノジド	3.70	33.2	368.5	313.0	positive
トルフェナム酸	5.17	34.8	261.7	262.0	positive	ピラタロストロピン	3.99	35.1	387.8	387.9	positive
ピチオノール	5.91	36.8	356.1	354.7	negative	ペンフロカルブ	4.30	36.5	410.5	411.0	positive
チキシクロザニド	6.04	34.3	401.5	401.8	positive	トリフロキシストロピン	4.50	35.8	408.4	409.0	positive
デロキネート	7.8	36.6	417.5	418.2	positive	キノキシフェン	4.66	36.4	308.1	309.8	positive
ワオキシニド	8.14	38.1	626.0	497.8	negative	クロキシントセットメキシル	5.01	36.1	335.8	336.0	positive
農薬/動物薬	log Pow	保持時間 (min)	MW	m/z	イオン化モード	ルフェニロン	5.12	36.2	511.2	508.9	negative
シロマジン	-0.06	2.5	166.2	167.0	positive	カルボスルファン	5.57	29.1	380.6	222.0	positive
トリタロルホシ	0.51	23.2	257.4	258.8	positive	エトキサゾール	5.59	37.4	359.4	361.0	positive
オキシソリニク酸	0.94	26.0	261.2	261.9	positive	ピリダベン	6.37	38.1	364.9	365.0	positive
プロボキスル	1.52	29.0	209.2	210.0	positive						
チアベンダゾール	2.47	18.1	201.3	201.9	positive						
ワルファリン	2.60	31.7	308.3	308.9	positive						
フェノプロカルブ	2.78	32.0	207.3	208.0	positive						
イソプロチオラン	2.88	33.6	290.4	290.9	positive						
ダイアジノン	3.81	35.3	304.3	305.0	positive						
エトキシキン	3.87	29.9	217.3	218.0	positive						
ジフルベンズロン	3.88	33.3	310.7	310.9	positive						
ホキシム	4.39	35.4	298.3	298.9	positive						
チアムリン	4.75	26.9	493.7	494.1	positive						
アレシリン	4.78	36.9	302.4	303.0	positive						
エマメクタン (8,9-E)	5.00	31.2	885.5	886.5	positive						
エマメクタン (8,9-Z)	5.00	31.7	885.5	886.6	positive						
ベルメトリン	6.5	38.5	391.3	242.0	positive						
シハロトリン	6.8	37.9	449.9	448.0	negative						

表2 各方法における農薬等の回収率の中央値 (%)

	農薬 (29)	動物薬 (25)	農薬兼動物薬 (18)	全体 (72)
動物薬試験法(筋肉)	83	84	86	84
動物薬試験法(肝臓)	62	72	75	72
動物薬試験法改法(肝臓)	86	77	78	80
農薬試験法(筋肉)	67	2	58	31
農薬試験法(肝臓)	65	4	54	21
農薬試験法改法(肝臓)	78	81	84	79

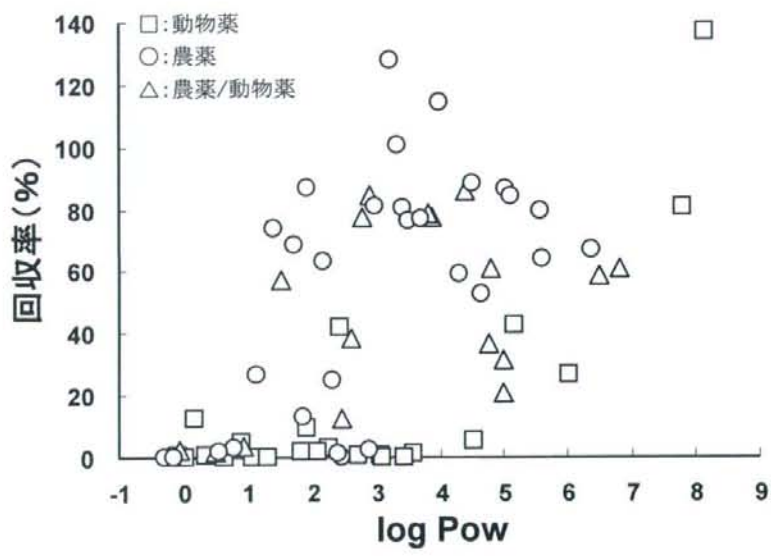


図1. 既存農薬一斉試験法 (アセトン/ヘキサン抽出) による筋肉からの検討対象農薬等の回収率

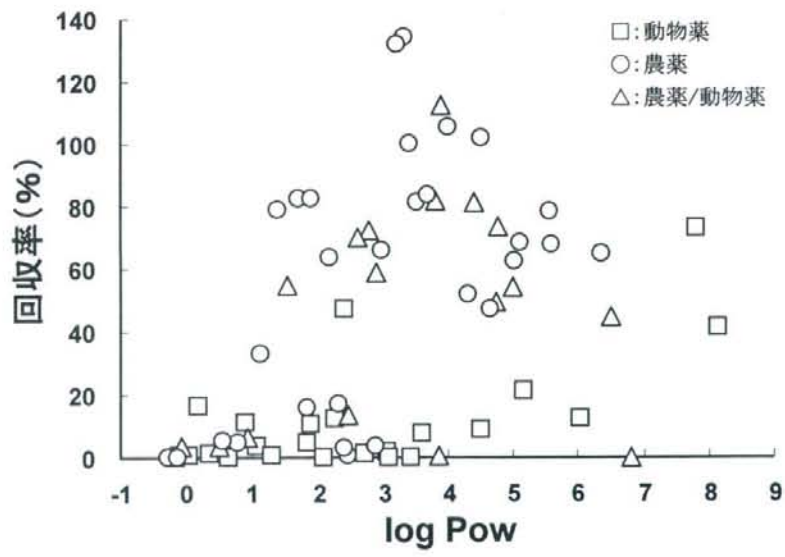


図2. 既存農薬一斉試験法 (アセトン/ヘキサン抽出) による肝臓からの検討対象農薬等の回収率

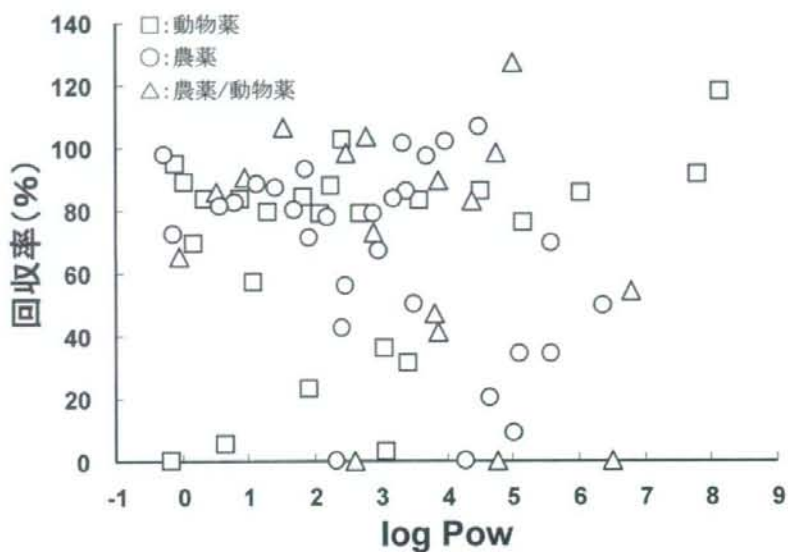


図3. 農薬試験法改法（アセトン/ヘキサン抽出後、水層を抽出）による肝臓からの検討対象農薬等の回収率

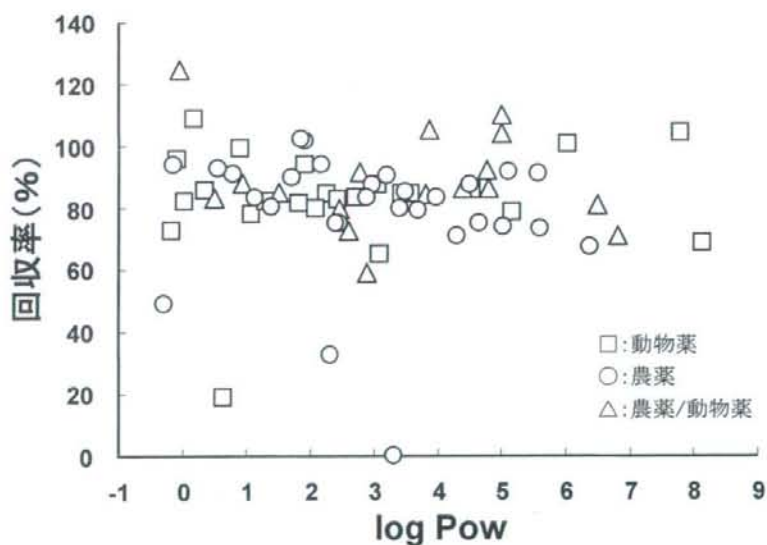


図4. 既存動物薬一斉試験法（アセトニトリル/ヘキサン抽出）による筋肉からの検討対象農薬等の回収率

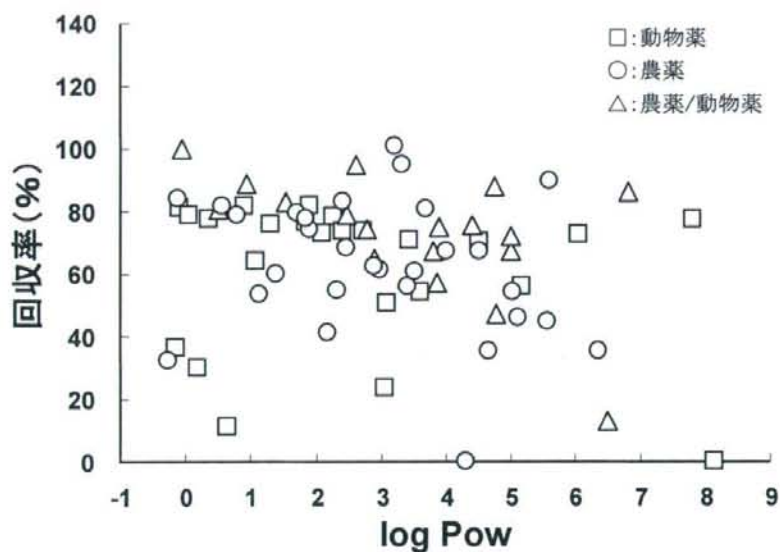


図5. 既存動物薬一斉試験法 (アセトニトリル/ヘキサン抽出) による肝臓からの検討対象農薬等の回収率

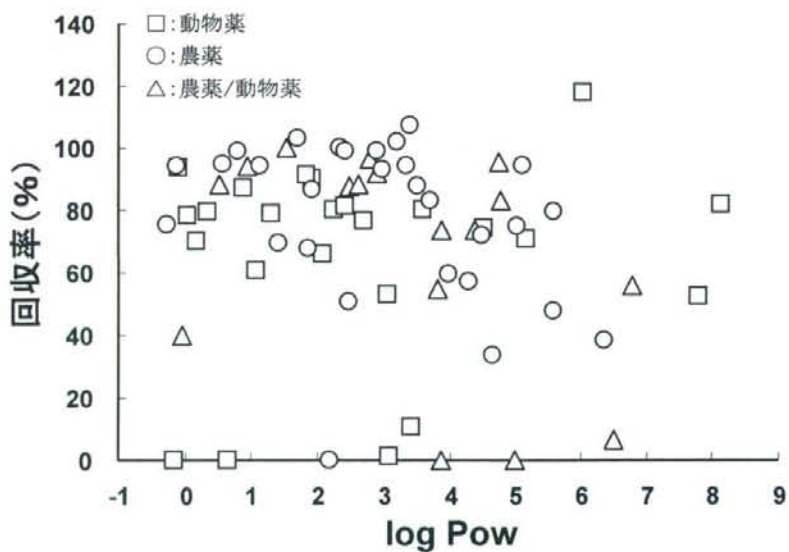


図6. 動物薬試験法改法 (含水アセトニトリル/ヘキサン抽出) による肝臓からの検討対象農薬等の回収率

II. 分担研究報告書

3. 農産物中残留農薬のGC・LC併用による残留実態解析

分担研究者 米谷民雄

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
平成20年度分担研究報告書

農産物中残留農薬のGC・LC併用による残留実態解析

分担研究者 米谷民雄 静岡県立大学・食品栄養科学部 客員教授

研究要旨

農産物およびその加工食品中にどれくらいの種類の残留農薬が含まれているか、その実態を把握するために、GC/MS および LC/MS を併用して農薬の一斉分析を実施した。同一農産物・加工食品について異なる地域・業者からの3製品を混合した試料を調製し、厚生労働省の通知試験法に準拠した方法により、429品目（茶の場合は378品目）の残留農薬を分析した。今年度は、①茶試料についての茶葉としての分析と熱湯抽出した飲茶としての分析、②ポストハーベスト農薬（国内では食品添加物）の使用が考えられる果実や、果皮も含めて基準値が設定されているため農薬が検出される可能性が高いと考えられる日本なし等の果実の分析、③次年度以降に食品加工による農薬の消長を調査する際の対象食品を選択するための農産物-加工食品の組み合わせについての予備調査を実施した。その結果、①茶葉では生産県別に3試料を作成したが、茶葉中の残留農薬は熱湯抽出時（飲茶を想定）にはあまり移行してこないことが再確認された。②抗菌剤（ポストハーベスト農薬）の使用が考えられた輸入かんきつ類（オレンジ、グレープフルーツ、レモン）では、イマザリル等の使用が確認された。③今後、食品加工時の残留農薬の消長を調べる際には、豆腐および関連食品が現実的な候補になると考えられた。また、加工食品中から農薬が検出されたが、原材料に戻って適否を判定するためには、加工係数を調査しておく必要性が再認識された。

A. 研究目的

農薬等のポジティブリスト制度の導入により、基準値が設定された農薬等の数が大幅に増加し、スタート時には799に達した。これら農薬等においては、当然ながら分析対象化合物の極性により、GC測定が適している品目とLC測定が適している品目がある。そのため、農薬の残留実態を調査するためには、両法を併用して分析する必要がある。

本分担課題では、今後の検査（試験）方針を考える際の資料とするため、どれくらいの種類の農薬が農産物やその加工食品中に残留しているかのデータを収集する目的で、GC/MS および LC/MS による一斉試験法を用いて、残留農薬を調査した。同一農産物や加工食品でも、栽培時に使用される農薬が異なることを考え、異なる3地域または3業者からの製品

の混合試料を調製して分析を行った。

昨年度は中国産と国内産の比較に重点をおいたが、今年度は、①茶試料についての茶葉としての分析と熱湯抽出した飲茶としての分析、②ポストハーベスト農薬（国内では食品添加物扱い）の使用が考えられる果実や、果皮も含めて基準値が設定されているため農薬が検出される可能性が高いと考えられる日本なし等の果実、③次年度以降に食品加工による農薬の消長を調べる対象食品を選択するための農産物-加工食品の組み合わせについての予備調査分析を実施することにした。一斉分析で、回収率にかかわらず、定量限界の0.01 ppm以上の数値が得られた農薬を比較することにした。なお、昨年度は定量限界の1/10以上検出された農薬についても trace（以下 tr と略す）として検出農薬に含めたが、

今年度の分析対象はマトリックスの影響により分析が困難な茶や加工食品が多いため、trとされた農薬については、参考のために検出数をあげるにとどめた。

B. 研究方法

国内で市販されている農産物および加工食品につき、異なる地域・業者の3製品を購入した。購入した農産物・加工食品とその生産地を表1に示す。分析試料としては茶葉3、抹茶1、ペットボトル入り飲茶1、オレンジ1、グレープフルーツ1、レモン1、日本なし1、アボカド1、マンゴー1、バナナ1、米2、日本酒2、赤ワイン2、大豆1、豆腐1、小麦粉1、うどん1、そば粉1、そば1、もち米1、もち1、食用油原料（オリーブ）1、食用油（オリーブ油）1である。

同一製品について混合試料を作成し、GC/MSおよびLC/MSにより、残留農薬を一斉分析した。

製品の購入と分析は、(株)住化分析センターに委託して実施した。同社では、厚生労働省が通知したポジティブリスト制度のための3つの一斉試験法（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）¹⁾に準じた方法により分析を実施している。すなわち、GC/MSによる農薬等の一斉試験法（農産物）をもとに193成分、LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅰ（農産物）をもとに185成分、LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅱ（農産物）をもとに51成分の分析を実施している。合計429成分である。表2に429成分のリストを示す。

なお、茶についてはLC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅱ（農産物）が適用できないため、対象農薬は378成分となる。

図1と図2に、通知一斉試験法に準拠した分析法フローチャートを示す。

また、茶については通知法に準じた方法で熱湯抽出したのものについても、GC/MSとLC/MSにより378農薬の分析操作を行った。具体的な抽出方法は以下の通りである。

「茶の熱湯抽出方法」

検体 9.00 g を 100°C の水 540 mL に浸し、

室温で5分間放置した後、ろ過し、冷後ろ液 300 mL (5 g 相当) (※) を 500 mL の三角フラスコに移した。再抽出には一斉試験法における方法を用い、アセトニトリルで再抽出し、グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製して、分析に供した。(※) 通知試験法では 360 mL であるが、濃度を算出する都合上、5 g 相当になるように 300 mL とした。

図3に、茶を熱湯抽出した場合の分析法フローチャートを示す。

また、GC/MSとLC/MS/MSの測定条件を以下に記す。

GC/MS 測定条件：カラム；DB-5MS 0.25 mm φ × 30 m 0.25 mm 膜厚 (J&W 社製)、キャリアガス；He、注入量；2.0 μL。

LC/MS/MS 測定条件Ⅰ：カラム；AQUITY UPLC™ BEH C₁₈ (1.7 μM) 2.1 × 10 mm (Waters 社製)、移動層；Solvent A: 5 mM ammonium acetate Solvent B: MeOH、注入量；10 μL。

LC/MS/MS 測定条件Ⅱ：カラム；AQUITY UPLC™ BEH C₁₈ (1.7 μM) 2.1 × 10 mm (Waters 社製)、移動層；Solvent A: ultra pure water Solvent B: 0.1% formic acid in MeOH、注入量；10 μL。

なお、分析委託先では定量限界を 0.01 ppm と設定していたが、それ未満でも検出された農薬も参考とするため、以下の基準をクリアしたのも tr として情報を収集した。すなわち、試料と標準品につき、定量イオンと確認イオンのピーク面積比を算出し、それぞれの比の相対値が 0.7~1.3 の範囲にあれば検出が確認されたとした（ただし、定量限界の 1/10 以上検出されるものに限った。また、農薬を検出したことを確実にするためには、別途、個別試験により確認する必要がある）。

C. 研究結果

1つの農産物・加工食品につき3地域または3業者の製品を入手し、それらを混合した試料についてGC/MSおよびLC/MS/MSにより残留農薬の一斉分析を実施した。分析値は基準値とは関係なく、小数点以下2桁まで求めた。

1. 茶試料の分析結果

茶試料で定量限界の0.01ppm以上検出された農薬を表3に示す。茶葉の混合試料①②③はそれぞれ産地別の3製品を混合した試料であるが、それぞれ2、8、6種の農薬が0.01ppm以上検出された。殺虫剤と殺菌剤であった。trとして検出された農薬を加えても、3製品の検出農薬数の順序は変わらなかった。

抹茶混合試料④では11農薬と茶試料では最多の農薬が定量されたが、trの農薬を加えた場合でも最多となった。一方、ペットボトル入りで市販されている飲茶⑤では、定量限界以上検出された農薬はなかった。

飲茶を入れる際の熱湯抽出では、茶葉に含まれている農薬の一部分しか抽出されないと考えられている。そこで、茶試料①②③につき熱湯抽出を行い分析を行ったところ、0.2、1種の農薬しか定量されなかった。trを加えても、それぞれ1、7、5農薬であった。茶試料②と③では熱湯抽出した場合にもテブコナゾールが定量できたが、濃度は約1/5になった。なお、茶試料②においては、熱湯抽出で検出されたアゾキシストロビンの値が茶葉と同じであったが、log Powが2.5であることを考えると、元の混合試料が不均一であったのかもしれない。

2. ポストハーベスト農薬使用の可能性がある果実および果皮も含めた基準値が設定されている果実の分析結果

表4に分析結果を示す。かんきつ類ではオレンジで2農薬、グレープフルーツで4農薬、レモンで1農薬が定量できた。いずれにおいても抗菌剤イマザリルが0.5 ppm以上検出され、グレープフルーツではオルトフェニルフェノールも0.79 ppm検出された。このように、食品添加物に指定されているポストハーベスト農薬(抗菌剤)がいずれの試料からも検出された。なお、同様の法的扱いがされているジフェニルとチアベンダゾールは今回の分析法では分析対象外である。

果皮も含めて基準値が設定されている果実では、日本なしで3農薬、アボカドで0農薬、マンゴーで5農薬、バナナで3農薬が、混合試料中で0.01 ppm以上のレベルで検出された。なお、マンゴーのフェントエートの分析にお

ける回収率は200%以上であり、正確な値を得るためには、精製操作を加えたり、個別分析法を用いる必要がある。

3. 農産物-加工食品の組み合わせの分析結果

次年度以降に食品加工による農薬の消長を調べることを計画しているが、今年度はその調査に用いる現実的な対象食品を選択する目的で、農産物-加工食品の組み合わせについて、市販品の残留農薬分析を行った。その結果を表5に示す。

米-日本酒の組み合わせでは、米試料①から1農薬(ジノテフラン、殺虫剤)が検出されたのみであった。ただし、0.01 ppm未満のtrレベルでは試料①でさらに3農薬、試料②で5農薬が検出された。日本酒試料①②からは、0.01 ppm以上の農薬は検出されなかった。

ブドウ-赤ワインでは、ワイン製造用のブドウが入手できなかったため、赤ワインのみを分析したが、1試料からクレソキシムメチル(べと病や晩腐病の予防剤)が検出された。

大豆-豆腐では、両者ともプロシミドン(殺菌剤)が0.01 ppm以上検出された。豆腐での濃度は大豆の約1/6であった。

小麦粉-うどんでは、小麦粉(輸入品)でのみメトプレン(殺虫剤)が定量限界以上検出されたが、そば粉-そばでは、いずれからも0.01 ppm以上の農薬は検出されなかった。trレベルでも、農作物-加工食品の組み合わせで共通の農薬は、両組み合わせとも検出されなかった。

もち米-もちでは、もち米においてのみ、低濃度でフェリムゾン(殺菌剤)が検出されたが、もちではtrレベルでもフェリムゾンは検出されなかった。

一方、食用油原料-食用油では、加工された食用油においてのみ、2種の殺虫剤(クロルピリホスとフェンチオン)が低濃度ではあるが0.01 ppm以上検出された。今回の食用油原料(オリーブ)試料からは、両農薬はtrレベルでも検出されなかった。

D. 考察

混合試料を作成したため、個別製品と比べ

ると濃度が1/3になり、検出できなくなる農薬がある一方で、異なる3地域・業者の製品で違った農薬が残留している場合には、一度に検出できる可能性がある。一長一短ではあるが、残留してくる農薬の種類を調査する今回の目的では、混合試料を作成する方法を選択した。

1. 茶試料

3製品の混合試料として1検体ずつの分析結果ではあるが、検出農薬数は、定量限界以上の場合でもtrを含めた場合でも、静岡産の茶(茶試料①)が際だって少なかった。この結果が、地域において使用農薬が統一されている結果であるのか、他の理由によるのかは、現在のところ不明である。なお、多種の農薬が検出された茶試料②と③では、半数以上の農薬が両試料で共通して検出されている。

同じ茶試料を熱湯抽出した場合には、定量限界以上の濃度で検出された農薬数は最多でも2農薬になった。そのなかで、テブコナゾールは熱湯抽出時の茶試料②と③で検出されたが、濃度は茶葉の場合の約1/5であった。茶葉には農薬が含まれているが、熱湯で入れた飲茶には農薬はあまり移行しないことが、再確認された。

抹茶からは最も多種の農薬が検出された。これが、抹茶試料が3地域の混合試料であるために、地域で使用されている農薬が異なることを意味しているのか、抹茶であることも寄与しているのかは現在のところ不明であり、今後の調査課題である。

2. ポストハーベスト農薬使用の可能性が ある果実および果皮も含めた基準値が設定 されている果実

抗菌剤(ポストハーベスト農薬)の使用が考えられた輸入かんきつ類からは、アメリカ産とオーストラリア産に関係なく、イマザリル等が定量限界以上検出された。3製品の混合試料であるため、分析結果だけでは全製品に使用されていたのかわからないが、これらのかんきつ類(オレンジ、グレープフルーツ、レモン)の販売においては、使用している場合には店頭での表示が義務づけられており、購入時に確認できる制度になっている。

その他の果皮を含めて分析する果実では、多種の農薬が検出されると予想されたが、アボカドからは検出されなかった。

3. 農産物一加工品の組み合わせ

今回の組み合わせでは、大豆-豆腐において唯一、両者で同一農薬(プロシミドン)が定量限界以上検出された。次年度以降に食品加工時における残留農薬の消長を調べる際には、豆腐および関連食品が現実的な対象食品になると思われる。なお、偶然ではあるが、今回の大豆(0.17 ppm)と豆腐(0.03 ppm)で得られたプロシミドンの値は、最近報告された豆腐でのプロシミドンの加工係数0.22²⁾とほぼ一致していた。

一方、米や今回は分析できなかったがワイン用ブドウからは残留農薬が検出されると思われるが、日本酒やワインの製造には時間がかかり、また日本酒においては今回の分析結果から農薬濃度が低いと予想されるため、これらは実験的に農薬の消長を追跡するには適当な食品ではない。しかし、原材料に戻って適否を判定するためには、加工係数(希釈係数や濃縮係数)が必要となる。このことは、若干の農薬についてコーデックス基準由来の基準値が設定されている食用オリーブ油の場合も同様で、基準値が設定されていない農薬が一律基準を超えて検出された場合には、如何に原材料に戻って適否を判定するかが問題となる。各加工食品について、原材料の生産で使用される農薬の加工係数を求めておくことが望まれるが、大変な作業であることには間違いない。

E. 結論

GC/MS および LC/MS による一斉試験法により、農産物や加工食品中に残存している残留農薬の数と種類を、3製品の混合試料を作成して調べた。

①茶では生産県別に3県の試料を作成したが、茶葉中の残留農薬は熱湯抽出した場合(飲茶を想定)にはあまり移行してこないことが再確認された。また、抹茶(3県の混合試料で、茶葉の3県とは一致しない)においては、最も多種の農薬が検出された。その理由につ

いては、今後の検討課題として残されている。

②抗菌剤（ポストハーベスト農薬）の使用が考えられた輸入かんきつ類（オレンジ、グレープフルーツ、レモン）では、イマザリル等の使用が確認された。

③今後、食品加工時の残留農薬の消長を調べる際には、豆腐および関連食品が現実的な対象食品になると思われた。また、加工食品から農薬が検出されたため、原材料に戻って適否を判定するために、原材料の生産で使用される農薬の加工係数が必要なことも再認識された。現在、加工食品中の残留農薬分析法を国レベルで開発中であるが、分析法が設定されれば、今後ますます加工係数（希釈率、濃縮率）が必要になってくると思われる。

今回の分析では、通知試験法に準拠して429成分（茶の場合は378成分）を一斉分析したが、少なくとも国産品を分析する場合には、農薬の使用履歴の情報を入手し、的確に分析することが重要と考えられる。輸入品の場合にも情報の入手が必要であるが、情報が入手できない場合には検疫所での一斉分析によるモニタリング検査が重要になる。より有効なスクリーニング法の開発が望まれるところである。

F. 参考文献

- 1) 厚生労働省：「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」（平成17年1月24日付け食安発第0124001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知）別添
- 2) 坂ら：食衛誌 49, 160-167 (2008)

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

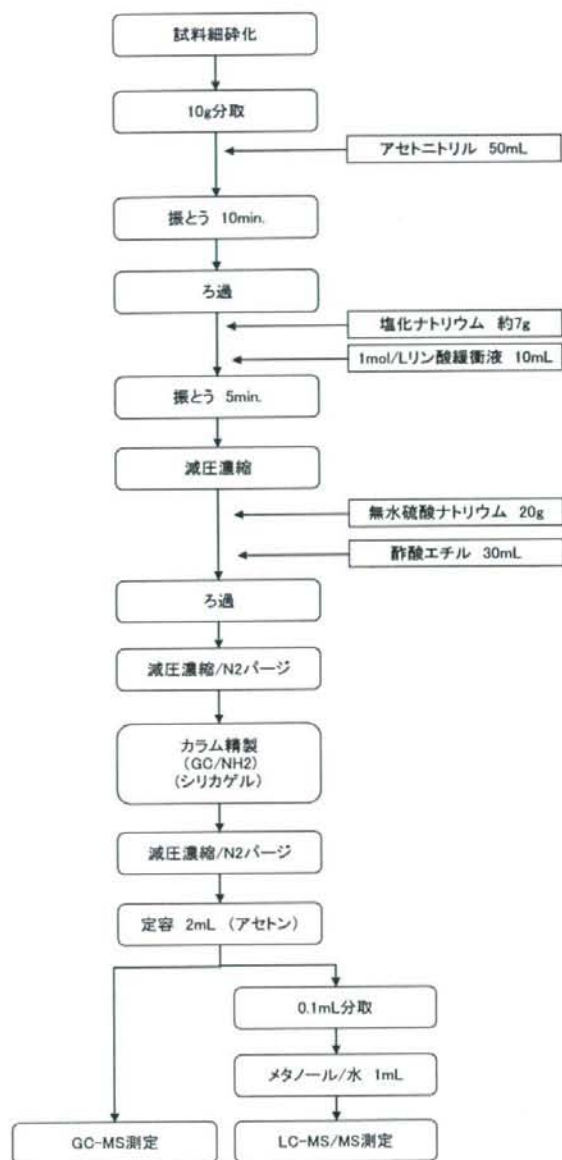


図1. 分析法フローチャート I

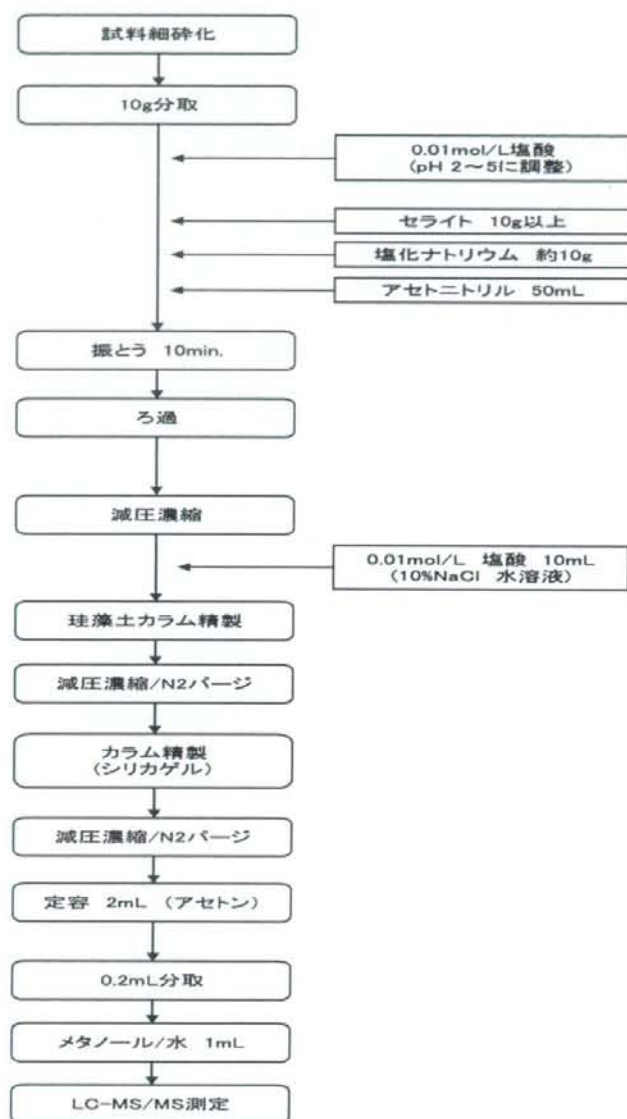


図2. 分析法フローチャートII

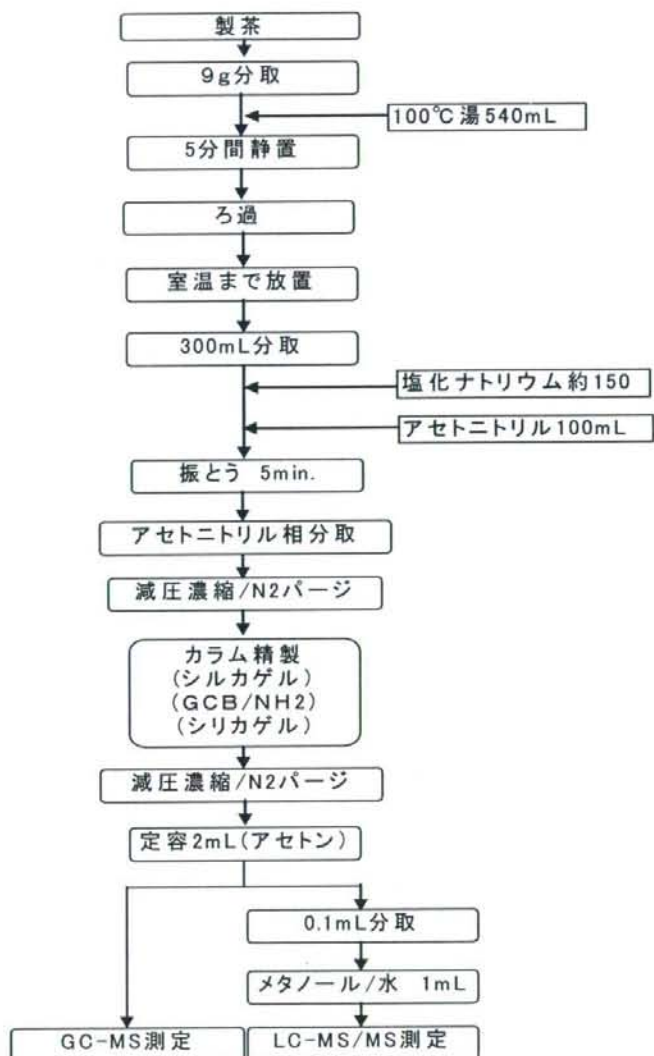


図3. 分析法フローチャートⅢ(茶熱湯抽出)