

201131019A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

食品中残留農薬等のスクリーニング分析法 の開発に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 根本 了

平成 24(2012)年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	
食品中残留農薬等のスクリーニング分析法の開発に関する研究 -----	1
根本 了	
II. 分担研究報告	
1. 新規分析技術を用いた農産物中残留農薬のスクリーニング分析法の開発 -----	15
根本 了	
齊藤 静夏	
2. 畜水産物中残留動物用医薬品及び農薬の包括的スクリーニング分析法の開発 --	49
坂井 隆敏	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	79
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	83

I. 総括研究報告

食品中残留農薬等のスクリーニング分析法 の開発に関する研究

研究代表者 根本 了

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
平成 23 年度総括研究報告書

食品中残留農薬等のスクリーニング分析法の開発に関する研究

研究代表者 根本 了 国立医薬品食品衛生研究所 食品部第一室長

研究要旨

食品に残留する農薬等に関するポジティブリスト制度の導入にともない、基準値が設定された農薬等は現在 830 品目を超える。更に、食品中の残留農薬等の安全性を確保するためには、このような膨大な数の品目について農産物及び畜水産物中の残留濃度を正確にかつ迅速に測定する必要があり、そのためにはより効率的で信頼性の高いスクリーニング分析法の開発が不可欠である。本研究では、食品に残留する農薬等のより効率的な検査の実施に資するスクリーニング分析法を開発するために、次の 2 つの分担研究を実施した。

1. 新規分析技術を用いた農産物中残留農薬のスクリーニング分析法の開発

農産物中の残留農薬の迅速で効率的なスクリーニング分析法開発の一環として、「抽出・精製」における迅速化・効率化を図るため、超臨界流体抽出(SFE)法の残留農薬分析への適用について検討した。SFE 法は低極性化合物の抽出に用いられることが多いため、LC-MS 測定対象化合物のように中~高極性化合物への適用例は少ない。そこで、LC-MS で測定可能な 123 化合物を用いて SFE 法に適した試料調製方法や SFE 条件(超臨界二酸化炭素密度、抽出温度、抽出時間等)を詳細に検討し、試料を SFE 後、クリーンアップなしで LC-MS/MS 測定する簡便なスクリーニング分析法を確立した。確立した方法により農産物を用いて添加回収試験を行った結果、検討した農薬の大部分は溶媒抽出法とほぼ同等の真度及び精度が得られた。また、農薬が残留した試料を用いて SFE 法と溶媒抽出法の分析値を比較した結果、一部の農薬を除き、両者はほぼ同等の結果が得られ、SFE 法は残留農薬スクリーニング分析法として有効であることが示された。

2. 畜水産物中残留動物用医薬品及び農薬の包括的スクリーニング分析法の開発

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、畜水産物に基準値が設定されている動物用医薬品及び農薬(農薬等)の包括的スクリーニング分析法の開発を試みた。

平成 23 年度は、畜水産物を対象とした効果的な精製方法を確立するため、種々の畜水産物試料中の測定の妨害となる夾雑成分のミニカラムを用いた除去方法について、農薬等約 160 化合物を用いて検討を行った。その結果グラファイトカーボンミニカラム精製により、多くの検討対象化合物に適用可能かつ色素等夾雑物を効果的に除去可能な精製法を確立した。また、シリカゲルミニカラム精製により、比較的多くの検討対象化合物に適用可能であり、高極性夾雑物の除去効果を有した精製法を確立した。また、豚肝臓を用いた検討の過程で、試料に農薬等を添加後、室温で放置すると回収率が大幅に減少する農薬等が確認された。これらの農薬等は試料調製中に減少し、正しい分析値を与えないことが考えられることから、試料調製中の減少を防止する方法についても追加検討し、試料調製中の農薬等の減少を防止する方法を確立した。

研究分担者

根本 了(国立医薬品食品衛生研究所
食品部第一室長)

坂井隆敏(国立医薬品食品衛生研究所
食品部主任研究官)

研究協力者

齊藤静夏(国立医薬品食品衛生研究所
食品部主任研究官)

A. 研究目的

食品に残留する農薬等(農薬、動物用医薬品及び飼料添加物)に関するポジティブリスト制度が平成 18 年 5 月 29 日に施行され、現在約 830 品目(農薬約 610 品目、動物用医薬品約 220 品目)の農薬等に基準値が設定されている。食品の安全確保のためには、食品中の残留農薬等を正確かつ迅速に測定し評価する必要があるが、このような膨大な数の品目を検査するためには、効率的で信頼性の高いスクリーニング分析法の開発が不可欠である。そのため本研究では、食品に残留する農薬等のより効率的な検査の実施に資するスクリーニング分析法を開発するために、次の 2 つの分担研究を実施した。

1. 新規分析技術を用いた農産物中残留農薬のスクリーニング分析法の開発

我々は平成 22 年度、「測定」における効率化を図るため、液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析計(LC-TOFMS)を用いた残留農薬分析について検討を行った。平成 23 年度は、「抽出・精製」の効率化・迅速化を図るため、超臨界流体抽出(SFE)法の残留農薬スクリーニング分析への適用について検討を行った。

SFE 法は、気体のような高い浸透性と液体のような高い溶解性を有する超臨界状態の流体を用いて抽出を行う方法である。超臨界流体として

用いられる二酸化炭素はヘキサン程度の低極性であるため、SFE 法はこれまで主に GC-MS 測定対象化合物のような低極性化合物の抽出に用いられており、LC-MS 測定対象化合物のような中～高極性化合物の検討例は少ない。そこで本研究では、LC-MS/MS で測定可能な中～高極性の農薬 123 化合物を用いて SFE 用試料の調製方法や SFE 条件を最適化し、試料を SFE 後、クリーンアップなしで LC-MS/MS 測定を行う簡便な分析法を確立した。確立した方法で農産物を用いて添加回収試験を行うとともに、農薬が残留した試料を用いて分析値を溶媒抽出法と比較し、SFE 法の残留農薬分析への適用性について検討したので報告する。

2. 畜水産物中残留動物用医薬品及び農薬の包括的スクリーニング分析法の開発

畜水産物中の農薬等の一斉試験法としては、動物用医薬品を対象とする 3 試験法と農薬を対象とする 2 試験法がそれぞれ通知されているが、動物用医薬品と農薬の両方を対象とする試験法は示されていない。そのため、畜水産物の残留農薬等の検査では、動物用医薬品と農薬を別々の方法で検査する必要がある。

そこで本研究では、検査機関における畜水産物のより効率的な検査体制の確立を目的として、畜水産物に基準値が設定されている動物用医薬品及び農薬を共通の方法で分析可能な、包括的一斉スクリーニング分析法の開発を試みた。平成 22 年度は、種々の畜水産物から可能な限り多くの動物用医薬品及び農薬を効率的に抽出可能な抽出方法及び脱脂精製法の開発を中心に検討を行った。平成 23 年度は、可能な限り多くの農薬等に適用可能であり、かつ種々の畜水産物中の測定の妨害となる試料マトリックス成分を効果的に除去可能な、ミニカラム精製条件

の確立を中心に検討を行った。

B. 研究方法

1. 新規分析技術を用いた農産物中残留農薬のスクリーニング分析法の開発

SFE 法に適した試料調製法について、水分やマトリックス含量の違いにより、果実・野菜、穀類及び茶の 3 種類の場合について検討した。次に、確立した試料調製法を用いて、各食品に最適な SFE 条件(①CO₂ 密度、②抽出温度、③抽出時間、④トラップからの溶出条件、⑤モディファイヤーの種類と量)を検討した。更に、確立した SFE 法の性能評価をするために、有機溶媒抽出法[通知一斉試験法「LC-MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」(食安発第 1129002 号 平成 17 年 11 月 29 日)]と、添加回収試験の結果及び農薬が検出された試料の分析値を比較した。

2. 畜水産物中残留動物用医薬品及び農薬の包括的スクリーニング分析法の開発

種々の畜水産物中の残留農薬等を効率的に分析するためには、様々な物性の農薬等を試料から効率的に抽出し、複雑な試料マトリックスを効果的に除去する方法の開発が必要である。初年度である平成 22 年度は、種々の畜水産物試料から、可能な限り多くの農薬等を効率的に抽出可能な抽出方法、並びにアセトニトリル/ヘキサン分配及び C18 ミニカラムを用いた脱脂精製法について検討した。平成 23 年度は、種々の畜水産物中の複雑な試料マトリックスを効果的に除去可能な精製方法について検討した。

検討対象化合物は、平成 22 年度と同様に、畜水産物に基準値が設定されている農薬等から、log Pow 値等を指標として、低極性から高極性まで偏りなく動物用医薬品 61 化合物、農薬 86

化合物及び農薬兼動物用医薬品 17 化合物、合計 164 化合物を選択して用いた。定量には LC-MS/MS の SRM 測定を用い、各農薬等の感度を評価した。精製方法の検討では、グラファイトカーボンミニカラム (Supelclean ENVI-Carb SPE Tubes、250 mg、SUPELCO 製) 及びシリカゲルミニカラム (InertSep SI、500 mg、GL Sciences 製) を用いて、カラムからの農薬等の溶出条件及び精製効果について詳細に検討し、最適な条件を求めた。グラファイトカーボンミニカラムの精製検討では、畜水産物の中でも色素等の夾雑物が多いと考えられる鶏卵、サケ及びしじみを用いた。シリカゲルミニカラムの精製効果は、牛の肝臓試料を用いた添加回収試験結果から考察した。なお、食品試料を用いた精製効果の検討には、昨年度検討した抽出精製方法 (アセトン抽出、アセトニトリル/ヘキサン分配及び C18 ミニカラム精製) で得られた溶液を用いた。

開発した方法を用いて、牛の脂肪、筋肉及び肝臓を対象に、各検討対象化合物が試料中濃度 0.01 mg/kg となるように添加し、3 併行の添加回収試験を実施した。なお、牛の脂肪は、均一化してから 40℃ で加温して融解した後、各検討対象化合物の標準溶液を添加し、攪拌後 -30℃ で 30 分間放置して再固化させたものを使用した。

(倫理面への配慮)

人、動物を研究対象としていないため特に倫理面の問題はない。

C. 研究結果

1. 新規分析技術を用いた農産物中残留農薬のスクリーニング分析法の開発

1.1 試料調製方法の検討

SFE 法の開発として、まず、SFE 法に適した試料調製方法について検討した。検討に当たっ

ては、水分含量の多い食品(果実・野菜)と乾燥試料(穀類及び茶)に分けて行った。

果実・野菜は水分含量が多いため、流体の流れが阻害され、ノズルやトラップが詰まるなどの影響を受ける。そこで、試料中の水分を除くために、トマト試料を用いて最適な乾燥剤の種類及び混合比を検討した。試料/セライト(1:1)混合物では、アセフェート等の高極性化合物が低回収率となったため、試料/セライト(1:1)に添加する乾燥剤として硫酸マグネシウム(無水)及び硫酸ナトリウム(無水)の効果について検討した。その結果、これらの乾燥剤の添加により回収率が改善され、そのうち効果のより大きかった硫酸マグネシウムを用いることとした。試料に混合する硫酸マグネシウム及びセライト量について検討した結果、果実・野菜の場合は、試料混合物[試料/セライト/硫酸マグネシウム(1:1:1)]4.5 gを用いて抽出を行うこととした。

穀類の試料調製方法について、玄米を用いて検討したところ、試料のみを用いた場合よりも、試料/セライト(1:1)混合物を用いた方が高回収率となる化合物が多かったことから、穀類の場合は試料/セライト(1:1)の試料混合物4 gを用いて抽出を行うこととした。また、茶は抽出されるマトリックス量が非常に多いことから、マトリックスによりトラップが過負荷となり農薬の捕集効率が低下することを防ぐため、試料/セライト(1:3)の試料混合物4 g(茶1 g相当)を用いて抽出を行うこととした。

1.2 SFE 条件の検討

次にトマトを試料として用いて、確立した試料調製方法により試料混合物を調製し、最適なSFE条件(CO₂密度、抽出温度、抽出時間、モディファイヤー等)を検討した。その結果、CO₂密度0.8 g/mL、抽出温度40°C及び抽出時間30分を用いることとした。また、SFEにより抽出された

農薬のトラップからの溶出には、夾雑成分との分離を考慮して、アセトニトリルを用いたところ、大部分の農薬は5 mL(2 mL/min)で高回収率が得られた。

SFEに用いた超臨界CO₂はヘキサン程度の低極性であるため、流体に極性溶媒をモディファイヤーとして添加して極性を調整することにより、極性の高い農薬の抽出効率を上げることについて検討した。そこで、モディファイヤーを試料に直接添加(抽出容器の底部、CO₂の流入側)し、最適なモディファイヤーの種類及び量を検討した。果実・野菜に最適なモディファイヤーについて、トマト試料を用いて検討した。その結果、検討に用いた溶媒(メタノール、アセトン及びアセトニトリル)のうち、アセフェート等の高極性化合物が最も高回収率となったメタノールをモディファイヤーとして0.2 mL添加して抽出を行うこととした。穀類の場合は、果実・野菜の場合と同様に、モディファイヤーとしてメタノールを添加しても回収率はほとんど改善されなかったが、更に水を添加したところ、回収率が改善された。そのため、穀類においては試料混合物に水及びメタノール各0.2 mLを添加して抽出を行うこととした。茶の場合は、穀類の場合と同様に、モディファイヤーとして水及びメタノールを選択し、添加量について検討した結果、穀類の場合と同様に、試料混合物(試料/セライト(1:3))に水及びメタノール各0.2 mLをモディファイヤーとして添加することとした。

1.3 開発したSFE法の評価

確立したSFE法を評価するために、市販のトマト、きゅうり、レモン、玄米及び茶を用いて、123化合物について添加濃度0.01 ppmで5併行の添加回収試験を行った。果実・野菜の場合は、検討した123化合物のうち、トマト、レモン及びきゅうりの3食品いずれにおいても真度の目標値

(70~120%)を満たさなかった農薬は、SFE 法では9化合物(約7%)、溶媒抽出法では7化合物(約6%)であり、両法間に大きな差は見られなかった。併行精度(RSD)は、いずれも目標値(<25%)を満たし、かつ両方法間で大きな違いは見られなかった。また、マトリックスの測定への影響についても、両方法間で特に差は見られなかった。以上の結果から、果実・野菜では、SFE後、精製操作なしでLC-MS/MS測定が可能であった。

乾燥試料(玄米及び茶)の場合は、SFE法は、併行精度(RSD)には問題がなかったものの、いずれも真度の目標値を満たさなかった農薬は、26化合物(約21%)であり、果実・野菜の場合よりも多かった。マトリックスの測定への影響については、SFE法では、玄米で12化合物(約10%)、茶で4化合物(約3%)において影響が見られた。なお、検討に用いた食品では、添加濃度0.01ppmの添加回収試験においては、検討した農薬はいずれも選択性に問題はなかった。

次に、確立したSFE法を評価するために、農薬が検出された試料を用いて、SFE法と溶媒抽出法の分析値を比較した。果実・野菜の場合は、トマト、レモン、キャベツ及びほうれんそうの5試料から、延べ9農薬が検出され、チオメキサム、シアゾファミド及びフルフェノクスロンの3農薬を除き、SFE法と溶媒抽出法とで、真度及び併行精度には、両方法間で大きな差は認められなかった。穀類の場合は、小麦及び大麦の3試料から、延べ4農薬が検出され、SFE法と溶媒抽出法とで、真度及び併行精度に大きな差は認められなかった。茶の場合は、煎茶3試料から延べ16農薬が検出された。併行精度については、両方法間で大きな差は認められなかったが、検出された農薬のうち12農薬は溶媒抽出法より分析値が低くなった。なお、いずれの検討においても、

検出された農薬は全て基準値未満であった。

2. 畜水産物中残留動物用医薬品及び農薬の包括的スクリーニング分析法の開発

2.1 LC-MS/MS測定における検討対象化合物の測定感度等

選択した164検討対象化合物のうち、154化合物(検討対象化合物の94%)において、5ng/mLの溶媒標準溶液(試験溶液中10ng/mL相当)の測定で、S/N \geq 10の測定感度が得られた。

2.2 グラファイトカーボンミニカラム精製

グラファイトカーボンミニカラムからの各検討対象化合物の溶出挙動を、アセトン及び*n*-ヘキサン(1:1)混液、アセトン、トルエン及び*n*-ヘキサン(10:1:9)混液、アセトン及びトルエン(9:1)混液、アセトン、トルエン及びメタノール(8:1:1)混液、酢酸エチル、トルエン及びメタノール(8:1:1)混液について検討した。また、精製効果について、鶏卵、サケ及びしじみの抽出溶液を用いて、グラファイトカーボンミニカラムによる色素等夾雑物の除去効果を視覚的に確認した。その結果、各食品由来の色素(淡黄色又は淡橙色)は、グラファイトカーボンミニカラム精製により除去され、ほとんど無色透明の試験溶液が得られた。

2.3 シリカゲルミニカラム精製

シリカゲルミニカラムからの溶出溶媒について、各検討対象化合物の回収率が高く、かつ測定の妨害となる極性の高い夾雑成分の除去効果に優れた、溶媒の種類と組合せについて検討した。その結果、アセトンを溶出溶媒として用いた場合には118化合物、アセトニトリルの場合は106化合物、メタノールの場合は142化合物について良好な回収率(70%~120%)が得られた。また、アセトン、*n*-ヘキサン及びメタノール(1:3:1)混液では138化合物、酢酸エチル、*n*-ヘキサ

ン及びメタノール(2:2:1)混液では 137 化合物について良好な回収率が得られた。

また、牛の肝臓試料を用いた添加回収試験を行い、シリカゲルミニカラム精製の効果を確認した。その結果、アセトン、*n*-ヘキサン及びメタノール(1:3:1)混液、もしくは酢酸エチル、*n*-ヘキサン及びメタノール(2:2:1)混液を用いることにより、良好なカラム回収率及び精製効果が得られた。

2.4 添加回収試験

牛の脂肪、筋肉及び肝臓を対象として、添加濃度 0.01ppm で添加回収試験を実施した。その結果、検討対象の 164 化合物のうち、一律基準濃度レベル(0.01 ppm)での定量が可能と思われる 154 化合物のうち、良好な回収率(70%~120%)が得られたのは、牛の脂肪では 92 化合物、牛の筋肉では 100 化合物、牛の肝臓では 90 化合物であった。また、検討した 3 試料全てで良好な回収率が得られた化合物数は 77 であった。なお、回収率が 70%未満になった化合物数は、牛の脂肪で 42、牛の筋肉で 36 及び牛の肝臓で 37 であった。また、回収率が 120%を超えた化合物数は、牛の脂肪で 20、牛の筋肉で 18 及び牛の肝臓で 27 であった。

D. 考察

1. 新規分析技術を用いた農産物中残留農薬のスクリーニング分析法の開発

1.1 試料調製方法の検討

SEF 法を実施するためには、果実・野菜のような水分含量の多い食品では、そのままでは過剰な水分のために、超臨界流体の流れが阻害され、ノズルやトラップが詰まるなどの影響を受ける。そのため、試料中の水分を保持するために試料にセライト等のケイソウ土を添加することが効果的であった。しかし、アセフェートなどの高極性高極性化合物では、ケイソウ土のみでは不十分

であり、更に乾燥剤として硫酸マグネシウム(無水)を添加することにより回収率が改善された。これは、試料中の水が乾燥剤に水和されて除去されたことにより、水相に溶解していた高極性化合物が CO₂ に分配されたためと推察された。

乾燥試料の場合は、試料をそのまま抽出することが可能である。玄米を用いた検討から、ケイソウ土を試料と混合することにより、農薬の回収率が向上した。これは、ケイソウ土が分散剤となり、試料の表面積が大きくなったことにより、抽出効率が向上したためと思われる。茶はマトリックス量が非常に多いため、穀類の場合と等量の試料を抽出に用いると、トラップが茶の抽出物で過負荷となり、農薬の捕集効率が低下することから、セライトと混合する試料の比率を少なくする必要があった。

SFE 法を効率的に実施するためには、水分、脂肪、葉緑素などの食品マトリックスの含量などにより、食品の種類ごとに試料調製法を工夫すると良いことがわかった。

1.2 SFE 条件の検討

トマトを試料として用いて、確立した試料調製方法により試料混合物を調製し、最適な SFE 条件(CO₂ 密度、抽出温度、抽出時間、モディファイヤー等)を検討した。CO₂ 密度については、大部分の農薬は、CO₂ 密度が高いほど高回収率となったが、用いた装置の圧力上限の制約から CO₂ 密度は 0.8 g/mL を選択した。抽出温度については、CO₂ 密度 0.8 g/mL では、40℃で回収率が最大となる農薬が多かった。50℃では、抽出される食品マトリックスが増加し、トラップにおける農薬の捕集効率が低下するものと推察された。抽出時間については、大部分の農薬は 15 分~30 分で回収率に大きな違いは見られなかったが、アセフェートなどの高極性化合物では抽出時間を長くする必要があった。これは、高極性化合物

では、他の農薬より流体へ分配しにくいと考えられた。また、トラップ(ODS)からの溶出溶媒にアセトニトリルを用いることにより、脂肪等の夾雑成分と農薬との分離がある程度可能であった。

超臨界流体に添加するモディファイヤーの検討から、果実・野菜の場合は、アセフェートなどの高極性化合物を抽出するためには、メタノールをモディファイヤーとして用いることが良いことがわかった。しかし、過剰のメタノールを用いると回収率が低下し、最適に添加量が存在した。これは、超臨界 CO₂ とともに移動した過剰なメタノールがトラップに捕集され、農薬等の捕集効率を低下させるためと推察された。一方、玄米を用いた検討から、穀類の場合は、モディファイヤーとしてメタノールのみを添加した場合には、あまり回収率の改善は見られなかったが、更に水を添加すると効果的であった。穀類は、果実・野菜と比較して水分含量が少ないことが原因と考えられ、乾燥試料の場合は、水もモディファイヤーとして有効であることが示された。茶の場合は、メタノールをモディファイヤーとして用いた場合、0.5 mL 添加で高極性化合物を含めた大部分の農薬の回収率が改善されるものの、無添加の場合と比べて SFE 抽出液中の色素等の夾雑成分の量が多くなった。これは、茶は抽出されるマトリックス量が多いため、メタノールの場合、溶媒量が多いとトラップ(ODS)の保持能が低下し、低極性の夾雑成分が溶出されやすくなるためと考えられた。そこで、メタノールの量を減らして代わりに水を添加したところ、回収率を維持したまま、溶出される夾雑成分の量を減少させることができた。これは、水は超臨界 CO₂ への溶解性が低いことから、試料に留まって試料マトリックスと農薬との相互作用を弱め、一方、メタノールは超臨界 CO₂ に溶解しやすいことから、超臨界 CO₂ に溶解して超臨界 CO₂ の極性を高めたことによ

り、農薬が流体に分配しやすくなったためと考えられた。水とメタノールのように、超臨界 CO₂ への溶解性が異なる、従ってモディファイヤーとしての作用機序の異なる 2 種類の溶媒を用いたことにより、回収率を維持したまま、過剰なメタノールによるトラップの捕集効率の低下を回避することができた。また、これまでの検討から、捕集に固相トラップを用いる方法では、SFE 条件設定において、トラップにおける捕集効率が重要な因子の一つであった。

1.3 開発した SFE 法の評価

開発した SFE 法を評価するために、123 化合物について、トマト、きゅうり、レモン、玄米及び茶を用いた、添加濃度 0.01 ppm での添加回収試験を行い、溶媒抽出法(通知一斉試験法)と比較した。

果実・野菜では、SFE 法と溶媒抽出法は、検討した大部分の農薬では、真度、精度及び選択性においてほぼ同等の結果が得られた。SFE 法で真度が低かった化合物は、イマザリルなどのトラップからの回収率が低い農薬であり、溶媒抽出法ではオキシカルボキシンなど主に GC/PSA 積層ミニカラムから溶出されにくい農薬であった。アセフェートなどの高極性の農薬は、溶媒抽出法では塩析の際に水層へ一部移行し真度が低下した。一方、これらの農薬に対しても SFE 法では、良好な真度が得られたことから、SFE 法は溶媒抽出法では分析が困難な高極性化合物にも適用可能であることが示された。

乾燥試料(玄米及び茶)では、SFE 法では、真度の目標値を満たさなかった農薬は果実・野菜の場合よりも多かった。また、一部の農薬ではマトリックスの影響を受けていたため、マトリックスの影響を補正した補正真度を用いて、SFE 法と溶媒抽出法の回収率を比較した。その結果、SFE 法において補正真度が 70%以下となった農薬

は、果実・野菜の場合は 9 化合物であったのに対して、17 化合物となり、果実・野菜の場合と比べて多かった。特に、ネオニコチノイド系農薬の真度が低い傾向があったことから、共通構造部分が試料成分と相互作用し、抽出されにくい状態となっている可能性が考えられた。

これらの結果から、SFE 法は、試料中の水分含量や試料中の成分により抽出効率が大きく異なることが示唆され、試料毎に SFE に供する試料調製方法を検討する必要があると考えられた。

次に、確立した SFE 法を評価するために、農薬が検出された試料を用いて、SFE 法と溶媒抽出法の分析値を比較した。果実・野菜の場合は、試料から検出された 9 農薬のうち、チオメキサム、シアゾファミド及びフルフェノクスロンを除き、SFE 法と溶媒抽出法でほぼ同等の分析値及び併行精度が得られた。同じ分析値とならなかった、チアメキサムは、SFE 法による添加回収試験において低回収率であったことが原因であった。シアゾファミド及びフルフェノクスロンについては、両方法間で回収率には大きな差が見られなかったことから、これらの農薬は、実際の残留状態では、試料マトリックスとの相互作用が強く、SFE 法で抽出力が不十分であった可能性がある。穀類の場合は、小麦及び大麦の 3 試料から、延べ 4 農薬が検出されたが、SFE 法と溶媒抽出法とで分析値及び併行精度に大きな差は認められなかった。茶の場合は、両方法間で併行精度には大きな差は認められなかったものの、SFE 法の方が分析値が低くなった農薬が多かった。SFE 法では、マトリックスの測定への影響が見られたことから、SFE 条件のほか、抽出液の追加精製についても今後検討する必要があると考えられた。

2. 畜水産物中残留動物用医薬品及び農薬の包括的スクリーニング分析法の開発

2.1 LC-MS/MS 測定における検討対象化合物の測定感度等

本研究で用いた 164 検討対象化合物のうち、154 化合物(検討対象化合物の 94%)については、分析法の濃縮倍率が 0.5 倍(0.5 g 試料/mL 試験溶液)以上であれば、一律基準濃度レベル(0.01 ppm)での定量が可能であることが推察された。

2.2 グラファイトカーボンミニカラム精製

平成 22 年度に検討した脱脂精製法(アセトニトリル/ヘキサン分配及び C18 ミニカラム精製)だけでは、鶏卵、サケ及びしじみ等の試料で得られる試験溶液は有色であり、色素等の夾雑成分の除去効果が低いことが確認された。そこで本年度は、色素等夾雑成分の除去を目的としたグラファイトカーボン精製について検討した。

まず、種々の溶出溶媒を用いて各検討対象化合物のグラファイトカーボンミニカラムからの回収率を調査した。アセトン及び *n*-ヘキサン(1:1)混液では溶出が不十分な化合物が見られたが、トルエンを添加して、アセトン、トルエン及び *n*-ヘキサン(10:1:9)混液を用いることにより、溶出が改善された。また、溶出液に添加するトルエンの比率について検討したところ、カラムからの回収率及び溶出液の濃縮時間を考慮すると、1 割程度が適切であった。そのため、アセトン及びトルエン(9:1)混液を溶出液として用いた場合、更にカラムからの回収率が改善された。しかし、一部の高極性化合物については、なお回収率が低かったことから、溶出溶媒の極性を高めるためにメタノールを追加して、溶出液にアセトン、トルエン及びメタノール(8:1:1)混液を用いた場合には、これらの化合物の溶出が改善され。しかしながら、以降のシリカゲルミニカラム精製での

検討から、高極性夾雑成分が測定妨害となったことから、できるだけ極性化合物の溶出を抑えるために、回収率が劣る化合物が若干あるものの多くの検討対象化合物において良好な回収率が得られたことから、アセトン酢酸エチルに置き換えた、酢酸エチル、トルエン及びメタノール(8:1:1)混液をグラファイトカーボンミニカラムからの溶出液に採用した。グラファイトカーボンミニカラム精製を用いることにより、検討に用いた鶏卵、サケ及びしじみ由来の色素は除去され、ほとんど無色透明の溶出液が得られたことから、本精製操作により色素等の夾雑物を効果的に除去可能であった。

2.3 シリカゲルミニカラム精製

グラファイトカーボンミニカラム精製により、色素等の夾雑物を効果的に除去することが可能であったが、牛の肝臓試料を用いた検討から、高極性化合物が測定に影響することが判明したため、高極性夾雑物の除去を目的としてシリカゲルミニカラム精製の追加について検討した。

カラムからの溶出溶媒にアセトン及びアセトニトリルを用いたところ、いずれの溶媒も特に動物用医薬品において良好な結果が得られなかった。溶出溶媒にメタノールを用いた場合には、動物用医薬品の溶出が改善されたものの、牛の肝臓試料における回収率はほとんど改善されなかった。そこで、極性の高い夾雑物の除去効果が高く、かつ検討対象化合物の溶出にも適した溶出溶媒について、種々の溶媒の組合せ及び混合比率について検討した。その結果、アセトン、*n*-ヘキサン及びメタノール(1:3:1)混液もしくは酢酸エチル、*n*-ヘキサン及びメタノール(2:2:1)混液が、比較的多くの検討対象化合物に適用可能であり、かつ牛の肝臓試料由来の夾雑物を良好に除去可能であることが確認された。最終的には、極性がより低いと考えられる酢酸エチ

ル、*n*-ヘキサン及びメタノール(2:2:1)混液を選択した。

2.4 添加回収試験

昨年度に検討した抽出法及び脱脂精製法に、本年度検討したグラファイトカーボンミニカラム精製及びシリカゲルミニカラム精製を追加し、牛の脂肪、筋肉及び肝臓を対象として添加回収試験を実施した。なお、農薬等の試料中での分解を抑制するために、試料にエタノール及び酢酸(9:1)混液を等量加える操作を追加した。また、アセトニトリル/ヘキサン分配における層分離を促進するために、アセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルの組合せに変更した。更に、適用可能な農薬等の範囲を拡大し、かつ脱脂効果を高めるために、C18 ミニカラムからの溶出液をアセトニトリル及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH 4.5) (9:1) 混液に変更した。

その結果、一律基準濃度レベル(0.01 ppm)での定量が可能と思われる 154 化合物のうち、牛の脂肪では 92 化合物、牛の筋肉では 100 化合物、牛の肝臓では 90 化合物において、回収率 70%~120%の結果が得られた。また、検討した 3 試料全てで 70%~120%の回収率が得られた化合物数は 77 であった。各検討対象化合物の基準値は、各食品との組合せにより様々であり、今回実施した一律基準値(0.01 ppm)濃度での添加濃度で良好な結果が得られなかった場合でも、より高濃度の基準値が設定されている農薬等では、得られた試験溶液を希釈することにより、夾雑成分による測定への影響も低減され、適用可能な化合物数は増加することが予想された。

一方、牛の肝臓試料を用いた添加回収試験では、70%~120%の回収率が得られた化合物数は 90 であったが、シリカゲルミニカラム精製で

の検討では 100～110 化合物であり、両者に差が見られた。このように異なる結果が得られる原因を究明し、抽出・精製条件を改善することにより、より多くの検討対象化合物に対して安定かつ良好な結果が得られる分析法の確立が可能であると推察された。

E. 結論

1. 新規分析技術を用いた農産物中残留農薬のスクリーニング分析法の開発

LC-MS(/MS)で測定可能な 123 化合物を用いて SFE 法用の試料調製方法及び SFE 条件(CO₂ 密度、抽出温度、抽出時間、モディファイヤー等)を最適化し、試料を SFE 後、精製操作を行わずに LC-MS(/MS)で測定する簡便な方法を開発した。確立した SFE 法の性能を評価するために、添加回収試験結果及び農薬が検出された試料の分析値を溶媒抽出法と比較した。一部の農薬を除き、検討した農薬の大部分は真度及び併行精度の目標値を満たした。特にアセフェート等の高極性の農薬に対しては、SFE 法の方が溶媒抽出法より良好な結果であった。農薬が検出された試料の分析値は、果実・野菜及び穀類では、SFE 法と溶媒抽出法とでほぼ同等の結果が得られた。これらの結果から、SFE 法は GC-MS(/MS)測定対象化合物のみならず、LC-MS(/MS)測定対象化合物についても適用可能であることが示された。SFE 法は溶媒抽出法と比較して大幅に操作が簡略化され、迅速・効率的な残留農薬スクリーニング分析法として有効であると考えられる。また、SFE 法は自動化が可能であることから、分析精度の向上、個人差に由来する変動の低減が期待される。しかしながら、茶では SFE 法と溶媒抽出法の分析値に差が認められた農薬もあったことや、試料中のマトリックス成分や水分含量、実際の農産物中の残留状

態などによって、抽出効率が異なる場合があることから、SFE 法を用いる場合には農薬が残留した試料を用いて溶媒抽出法と同等の分析値が得られることを確認する必要があると考えられた。

2. 畜水産物中残留動物用医薬品及び農薬の包括的スクリーニング分析法の開発

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、畜水産物に基準値が設定されている動物用医薬品及び農薬を対象として、これらの包括的スクリーニング分析法の開発を試みた。平成 23 年度は、昨年度に検討したアセトン抽出法及び脱脂精製法に追加して実施する、色素や高極性化合物等の夾雑成分の除去を目的としたミニカラム精製法について検討した。その結果、グラファイトカーボンミニカラムを用いて、多くの検討対象化合物に適用可能、かつ色素等夾雑物を効果的に除去可能な精製法を確立した。また、改良の余地は残るものの、シリカゲルミニカラムを用いて、多くの検討対象化合物に対して適用可能で、高極性夾雑物の除去効果を有した精製法を確立した。

次年度は、本年度検討した分析法のその他の畜水産物への適用性を検証しながら、精製条件等の改良を行い、種々の畜水産物中の多くの農薬等を効率的かつ高精度に分析可能な分析法の確立を試みる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

齊藤静夏、根本 了、松田りえ子:LC-MS(/MS)による農産物中のピンドン分析法、食品衛生学

雑誌、52(4)、237-243(2011)

齊藤静夏、坂井隆敏、根本 了、松田りえ子：
LC-MS/MS による畜水産物およびはちみつ中
の 4-ヒドロキシクマリン系殺鼠剤分析法、食品衛
生学雑誌、52(4)、244-250(2011)

齊藤静夏、坂井隆敏、根本 了、松田りえ子：
LC-MS/MS による畜水産物およびはちみつ中
のピンドン分析法、食品衛生学雑誌、52(5)、
294-298(2011)

2. 学会発表

齊藤静夏、坂井隆敏、根本 了、松田りえ子：
農産物中のピンドン試験法の開発、第 101 回日
本食品衛生学会学術講演会(2011.5)

齊藤静夏、根本 了、松田りえ子：LC-TOFMS
を用いた農産物中残留農薬分析の検討、第 102
回日本食品衛生学会学術講演会(2011.9)

坂井隆敏、坂井英里、齊藤静夏、根本 了、

松田りえ子：畜水産物中のヒドロコルチゾン分析
法の開発、第 102 回日本食品衛生学会学術講
演会(2011.9)

坂井隆敏、齊藤静夏、根本 了、松田りえ子：
加工食品中に高濃度に残留する農薬等試験法
の検討-III、第 48 回全国衛生化学技術協議会
年会(2011.11)

齊藤静夏、坂井隆敏、根本 了、松田りえ子：
畜水産物中のプロディファコウム及びワルファリ
ン試験法の開発、第 48 回全国衛生化学技術協
議会年会(2011.11)

齊藤静夏、根本 了、松田りえ子：LC-MS/MS
による茶中の残留農薬一斉分析の検討、第 34
回農薬残留分析研究会(2011.11)

Ⅱ. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅱ．分担研究報告

1. 新規分析技術を用いた農産物中残留農薬の スクリーニング分析法の開発

研究分担者 根本 了

研究協力者 齊藤 静夏

新規分析技術を用いた農産物中残留農薬のスクリーニング分析法の開発

研究分担者 根本 了 国立医薬品食品衛生研究所 食品部第一室長

研究要旨

農産物中の残留農薬の迅速で効率的なスクリーニング分析法開発の一環として、「抽出・精製」における迅速化・効率化を図るため、超臨界流体抽出(SFE)法の残留農薬分析への適用について検討した。SFE法は低極性化合物の抽出に用いられることが多いため、LC-MS測定対象化合物のように中～高極性化合物への適用例は少ない。そこで、LC-MSで測定可能な123化合物を用いてSFE法に適した試料調製方法やSFE条件(超臨界二酸化炭素密度、抽出温度、抽出時間等)を詳細に検討し、試料をSFE後、クリーンアップなしでLC-MS/MS測定する簡便なスクリーニング分析法を確立した。確立した方法により農産物を用いて添加回収試験を行った結果、検討した農薬の大部分は溶媒抽出法とほぼ同等の真度及び精度が得られた。また、農薬が残留した試料を用いてSFE法と溶媒抽出法の分析値を比較した結果、一部の農薬を除き、両者はほぼ同等の結果が得られ、SFE法は残留農薬スクリーニング法として有効であることが示された。

研究協力者

齊藤静夏(国立医薬品食品衛生研究所食品部)

率化・迅速化を図るため、超臨界流体抽出(SFE)法の残留農薬スクリーニング分析への適用について検討を行った。

A. 研究目的

食品に残留する農薬等(農薬、動物用医薬品及び飼料添加物)に関するポジティブリスト制度が平成18年5月に施行され、現在約830品目(農薬約610品目、動物用医薬品約220品目)の農薬等に基準値が設定されている。食品の安全確保のためには、食品中の残留農薬等を正確かつ迅速に測定し評価する必要があるが、このような膨大な数の品目を検査するためには効率的で信頼性の高い測定系の確立が望まれる。

SFE法は、気体のような高い浸透性と液体のような高い溶解性を有する超臨界状態の流体を用いて抽出を行う方法である。超臨界流体として用いられる二酸化炭素はヘキサン程度の低極性であるため、SFE法はこれまで主にGC-MS測定対象化合物のような低極性化合物の抽出に用いられており、LC-MS測定対象化合物のような中～高極性化合物の検討例は少ない。そこで本研究では、LC-MS/MSで測定可能な中～高極性の農薬123化合物を用いてSFE用試料の調製方法やSFE条件を最適化し、試料をSFE後、クリーンアップなしでLC-MS/MS測定を行う簡便な分析法を確立した。確立した方法で農産物を用いて添加回収試験を行うとともに、農薬が残留した試料を用いて分析値を溶媒抽出法と比

我々は昨年度、「測定」における効率化を図るため、液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析計(LC-TOFMS)を用いた残留農薬分析について検討を行った。今年度は、「抽出・精製」の効

較し、SFE 法の残留農薬分析への適用性について検討したので報告する。

B. 研究方法

1. 試料

市販のトマト、レモン、きゅうり、玄米及び茶を用いた。トマト、レモン及びきゅうりは、フードカッターで細切均一化したものを用いた。玄米及び茶は遠心粉碎機で粉碎して均一化し、425 μm の標準網ふるいに通したものを用いた。

2. 試薬及び試液

有機溶媒は、関東化学(株)の残留農薬試験用試薬を用いた。硫酸マグネシウム(無水、特級)は関東化学(株)製を用いた。ケイソウ土(セライト 545)及び硫酸ナトリウム(無水、残留農薬試験用)は、和光純薬工業(株)製を用いた。試験溶液の調製で用いた水は、超高純度蒸留水精製装置で蒸留したものを用いた。ガラス繊維ろ紙(GF/F)は Whatman 社製を用いた。LC-MS/MS の移動相溶媒は、関東化学(株)製の LC-MS 用蒸留水及びメタノールを用いた。

表 1 に検討に用いた農薬(123 化合物)を示した。各農薬標準品は、林純薬工業(株)、関東化学(株)、和光純薬工業(株)、Dr. Ehrenstorfers 社及び Riedel-de Haën 社の残留農薬試験用試薬を用いた。標準原液(1000 mg/L)は、各農薬 10 mg を精秤し、アセトニトリル 10 mL に溶解して調製した。検量線作成用及び添加回収試験用の混合標準溶液は、各農薬の標準原液を混合し、メタノールで適宜希釈して調製した。

リン酸緩衝液(0.5 mol/L、pH 7.0)は、以下の通りに調製した。リン酸水素二カリウム(K_2HPO_4) 52.7 g 及びリン酸二水素カリウム(KH_2PO_4) 30.2 g を量り採り、水約 500 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液または 1 mol/L 塩酸を用いて pH を 7.0 に調整した後、水を加えて 1 L とした。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムは、Agilent 社製 Mega Bond Elut C18(担体量 1000 mg)を用いた。グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムは、ジーエルサイエンス社製 InertSep GC/PSA(担体量 500 mg/500 mg)を使用した。

3. 装置

遠心粉碎機は Retsch 社製 ZM200、フードカッターは Retsch 社製 Grindomix GM200、ホモジナイザーは Kinematica 社製 Polytron PT 10-35 GT を用いた。LC-MS/MS は、Waters 社製の高速液体クロマトグラフ Alliance 2695 及び同社製質量分析計 Micromass Quattro Premier を使用した。

SFE 装置は、日本分光(株)製の超臨界二酸化炭素流体抽出装置システムを用いた。

4. 測定条件

4.1 LC 条件

カラム: Inertsil ODS-4 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm 、ジーエルサイエンス社製);ガードカラム: Inertsil ODS-4 (内径 1.5 mm、長さ 10 mm、粒子径 3 μm 、ジーエルサイエンス社製);カラム温度: 40°C;注入量: 5 μL ;移動相: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(A液)及び 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液(B液);グラジエント条件 (t: 時間(分)): t_0 : B=15%、 t_1 : B=40%、 $t_{3.5}$: B=40%、 t_6 : B=50%、 t_8 : B=55%、 $t_{17.5}$: B=95%、 t_{33} : B=95%、 $t_{33.1}$: B=100%、 t_{43} : B=100%、 $t_{43.1}$: B=15%; 保持時間: 表 1 に示した。

4.2 MS 条件

イオン化モード: エレクトロスプレーイオン化法ポジティブモード(ESI(+))及びネガティブモード(ESI(-));測定モード: selected reaction monitoring (SRM);キャピラリー電圧: 3 kV;ソース温度: 120°C;フローガス: 50 L/h(N_2);

脱溶媒温度：400℃；脱溶媒ガス：800 L/h (N₂)；コリジョンガス：± 3.1 × e⁻³ mbar (Ar)；測定イオン、コーン電圧及びコリジョンエネルギー：表 1 に示した。

5. SFE 条件

最終的な SFE 条件を以下に示した。

CO₂ 密度：0.8 g/mL；抽出温度：40℃；CO₂ 流速：2.0 mL/min；抽出時間：30 分；トラップ：ODS (内径 4.6 mm、長さ 50 mm、粒子径 30 μm、充填量 0.45 g)；トラップ温度：30℃；トラップからの溶出：アセトニトリル 5 mL (2.0 mL/min) で溶出し、これを SFE 抽出液とした。その後、ヘキサン/アセトン (1:1) 10 mL (2.0 mL/min) で洗浄し、アセトニトリル 10 mL (2.0 mL/min) でコンディショニングを行った。

6. 試験溶液の調製

6.1 SFE 法

6.1.1 果実・野菜の場合

試料 5.0 g を乳鉢に採り、セライト 5.0 g を加えた後、無水硫酸マグネシウム 5.0 g を加えて、よく混合した。試料混合物 4.5 g (試料 1.5 g 相当) を抽出管に充填した。この時、試料の微粒子による目詰まりを防ぐため、ガラス繊維ろ紙を抽出管の両端に入れた。また、モディファイヤーとして抽出管の底部にメタノール 0.2 mL を添加して SFE 抽出を行った。得られた SFE 抽出液の溶媒を除去し、メタノールで正確に 3 mL としたものを試験溶液 (試料 0.50 g 相当/mL) とした。

6.1.2 穀類の場合

試料 5.0 g を乳鉢に採り、セライト 5.0 g を加えてよく混合した。試料混合物 4.0 g (試料 2.0 g 相当) を抽出管に充填した。この時、試料の微粒子による目詰まりを防ぐため、ガラス繊維ろ紙を抽出管の両端に入れた。また、モディファイヤーとして抽出管の底部にメタノール 0.2 mL 及び水

0.2 mL を添加して SFE 抽出を行った。得られた SFE 抽出液の溶媒を除去し、メタノールで正確に 4 mL としたものを試験溶液 (試料 0.50 g 相当/mL) とした。

6.1.3 茶の場合

試料 5.0 g を乳鉢に採り、セライト 15 g を加えてよく混合した。試料混合物 4.0 g (試料 1.0 g 相当) を抽出管に充填した。この時、試料の微粒子による目詰まりを防ぐため、ガラス繊維ろ紙を抽出管の両端に入れた。また、モディファイヤーとして抽出管の底部にメタノール 0.2 mL 及び水 0.2 mL を添加して SFE 抽出を行った。得られた SFE 抽出液の溶媒を除去し、メタノールで正確に 4 mL としたものを試験溶液 (試料 0.25 g 相当/mL) とした。

6.2 溶媒抽出法

通知一斉試験法「LC-MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」(食安発第 1129002 号 平成 17 年 11 月 29 日) に準じて以下のように行った。

果実・野菜の場合は試料 20.0 g を量り採った。玄米の場合は 10.0 g に水 20 mL を加え、30 分間放置した。茶の場合は 5.00 g に水 20 mL を加え、30 分間放置した。

これにアセトニトリル 50 mL を加え、約 1 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。残留物を採り、アセトニトリル 20 mL を加え、上記と同様にホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。

抽出液 20 mL を採り、塩化ナトリウム 10 g 及びリン酸緩衝液 (0.5 mol/L、pH 7.0) 20 mL を加えて 10 分間振とうした。茶の場合は、抽出液 5 mL を採り、アセトニトリル 15 mL、塩化ナトリウム 10 g

及びリン酸緩衝液 20 mL を加えて 10 分間振とうした。これを毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離を行い、分離した水層を捨てた。

ODS ミニカラム(1000 mg)にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに上記のアセトニトリル層を注入し、さらにアセトニトリル 5 mL を注入した。全溶出液を採り、40°C以下で約 1 mL まで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去した。残留物をアセトニトリル/トルエン(3:1)2 mL に溶解した。

GC/PSA 積層ミニカラム(500 mg/500 mg)にアセトニトリル/トルエン(3:1)を 10 mL 注入し、流出液は捨てた。このカラムに得られた溶液を注入した後、アセトニトリル/トルエン(3:1)20 mL(うち 2 mL で 3 回容器を洗浄した)を注入した。全溶出液を 40°C以下で約 1 mL まで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去した。残留物をメタノール(果実・野菜の場合は 8 mL、玄米及び茶の場合は 4 mL)に溶解したものを試験溶液(果実・野菜及び玄米の場合は試料 0.50 g 相当/mL、茶の場合は 0.25 g 相当/mL)とした。

7. 添加回収試験

市販のトマト、レモン、きゅうり、玄米及び茶を用いて試料中濃度 0.01 ppm で 5 併行の添加回収試験を行った。

8. 定量

添加回収試験における回収率 12.5、25、50、75、100 及び 150%相当濃度の標準溶液をメタノールで調製し、それぞれ 5 µL を LC-MS/MS に注入して、ピーク面積法で検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法により濃度を求めた。

9. 試料マトリックスの測定への影響

ブランク試験溶液(農薬を添加していない試料を用いて試験法に従って調製した試験溶液)

100 µL をバイアルに採り、窒素を吹き付けて乾固した後、残留物を添加回収試験における回収率 100%相当濃度の溶媒標準溶液(溶媒で調製した標準溶液)100 µL に溶解してマトリックス標準溶液とした。マトリックス標準溶液と溶媒標準溶液を交互に各 2 回測定し、溶媒標準溶液のピーク面積の平均値に対するマトリックス標準溶液のピーク面積の平均値の比を求めて試料マトリックスの測定への影響を評価した。

(倫理面への配慮)

人、動物を研究対象としていないため特に倫理面の問題はない。

C. 研究結果及び考察

1. SFE 法の開発

1.1 試料調製方法の検討

1) 水分含量の多い食品(果実・野菜)の場合

まず、果実・野菜のような水分含量の多い食品の試料調製方法について検討を行った。SFE では、試料に過剰な水が存在すると流体の流れが阻害され、ノズルやトラップが詰まるなどの影響を受ける。このため、試料にセライト等のケイソウ土や、硫酸マグネシウム等の乾燥剤を混合したものを抽出に用いることが多い。本研究では、水分含量の多い試料としてトマトを選択し、最適な乾燥剤の種類及び混合比を検討した。

乾燥剤の種類による影響を図 1 に示した。試料/セライト(1:1)混合物を用いて各農薬の回収率を求めたところ、アセフェート、メタミドホス、モノクロトホス等の高極性化合物が低回収率となった。これに対し、試料/セライト(1:1)に乾燥剤として硫酸マグネシウム(無水)や硫酸ナトリウム(無水)を加えたところ、極性の高い化合物の回収率が向上した。これは、試料中の水が乾燥剤に水和されて除去されたことにより、水相に溶解して

いた高極性化合物がCO₂に分配されたためと推察された。特にアセフェートやメタミドホスは、硫酸マグネシウムを加えることにより大幅に回収率が向上したことから、乾燥剤として硫酸マグネシウムを用いることとした。なお、乾燥剤として硫酸マグネシウム等の塩を用いると高極性化合物の回収率が改善する一方、低極性化合物の回収率は塩への吸着により低下することが報告されているが、今回検討に用いた農薬では低極性化合物においても乾燥剤添加による回収率の低下は見られなかった。

試料に混合する硫酸マグネシウム及びセライト量について検討した。図2に硫酸マグネシウムの量の影響を示した。試料混合物[試料/セライト(1:1)]3 gに硫酸マグネシウム0.75 gを混合した場合はアセフェートやメタミドホス等の高極性化合物が低回収率であったが、硫酸マグネシウム量を1.5 g または 2.25 g に増量したところ、いずれも高回収率が得られた。また、混合するセライト量を減らすと、試料混合物の粘性が高くなり、SFE に供することができなかった。これらの結果から、果実・野菜の場合は、試料混合物[試料/セライト/硫酸マグネシウム(1:1:1)]4.5 gを用いて抽出を行うこととした。

2) 乾燥試料(穀類及び茶)の場合

乾燥試料は試料をそのまま抽出することが可能であるが、セライト等の分散剤を試料と混合して表面積を大きくすると抽出効率が向上することが知られている。また、穀類のような脂質含量の多い食品では、過剰の夾雑成分によってトラップの保持能が低下し、低回収率となる可能性がある。そこで、玄米を試料として用いて、試料/セライト(1:1)混合物4 g(試料2 g相当)と試料のみ(4 g)での各農薬の回収率を比較した(図3)。その結果、試料/セライト(1:1)混合物の方が、試

料のみと比べて高回収率となる化合物が多かった。よって、穀類の場合は試料/セライト(1:1)の試料混合物4 gを用いて抽出を行うこととした。

茶はマトリックス量が非常に多いため、試料量を多くすると、トラップが過負荷となり、低極性の夾雑成分が溶出してしまう可能性が高い。このため、茶の場合は試料/セライト(1:3)の試料混合物4 g(茶1 g相当)を用いて抽出を行うこととした。

1.2 SFE 条件の検討

トマトを試料として用いて、確立した試料調製方法により試料混合物を調製し、最適なSFE条件(CO₂密度、抽出温度、抽出時間、モディファイヤー等)を検討した。

1.2.1 CO₂密度

CO₂密度の最適化を行うため、抽出温度を40°C、抽出時間を30分に設定し、更に後述するようにモディファイヤーとしてメタノール0.2 mLを添加して、CO₂密度0.3、0.5、0.7及び0.8 g/mL(圧力はそれぞれ8.2、9.1、11.4及び16.4 MPa)における各農薬の回収率を比較した。代表的な結果を図4に示した。大部分の農薬は、CO₂密度が高いほど高回収率となった。CO₂密度0.9 g/mLでは、用いた装置の圧力の上限である30 MPa付近となるため、CO₂密度は0.8 g/mLとすることとした。

1.2.2 抽出温度

抽出温度の影響について検討するため、CO₂密度0.8 g/mL及び抽出時間は30分に設定(モディファイヤーとしてメタノール0.2 mLを添加)し、抽出温度32(CO₂の臨界温度は31.5°Cであるため)、40及び50°C(圧力は、それぞれ12.4、16.4、21.4 MPa)における各農薬の回収率を比較した。その結果、40°Cで回収率が最大となる農薬が多かったことから(図5)、抽出温度は