

令和 2 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金 食品の安全確保推進研究事業

輸出先国のリスク管理に対応した残留農薬データ等の補完に関する研究

研究分担報告書

近年国際的に求められているリスク管理のための新規分析手法の開発と

国内導入に関する研究

研究代表・分担者 渡邊敬浩

国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

研究要旨

農林水産物・農産加工品(農産品等)の輸出促進のためには、国際整合した食品安全行政とそれによる取組が基本となる。農薬残留物の規制に関しては、国際整合した考え方や方法論に基づいて輸出先国により設定された最大残留基準値(MRL)への適合を確実にすることや、MRL が設定されていない場合には設定申請(インポートトレランス申請)することが具体的な方策となる。取組の 1 つとして、規制の目的で使用可能な簡易で迅速な分析法の提示も必要だが、わが国においては検証が十分でなく、国産農産品等輸出促進の障壁となる可能性があり解決すべき課題である。

本研究では、農薬残留物の簡易で迅速な分析法として国際的にも急速に認められつつある QuEChERS 法について、農薬を投与した結果としての残留物を含む試料(インカード試料)を用い、従来の分析法との比較を行いながら、厳密な性能評価を試みた。本年度研究においては、ジノテフラン及びエトフェンプロックスの残留物を含むコメ・インカード試料の作成に成功し、本試料の計画的な分析を通じて、QuEChERS 法の性能を評価するとともに試料調製方法等のさらなる検討につながる重要な知見を得た。

その他の課題として、国内流通する農産品における農薬残留物濃度の海外 MRL への適合度の検証を、先行研究により実施されたいちごの他にコメと茶を対象として実施した。その結果からも、わが国における適正な農業の実施の結果として生じる可能性のある濃度であることを科学的根拠に基づき実証し、インポートトレランス申請することが有効であると考えられた。

研究協力者

明治薬科大学薬学部

永山敏廣

日本食品分析センター

中村歩 渡邊文子 伊佐川聡

国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

松田りえ子

A. 研究目的

現在のわが国政府の方針として、農林水産物・農産加工品(農産品等)の輸出促進が掲げられている。食品安全行政の国際整合は、この政府方針に沿った取組の基礎となるため極めて重要である。例えば、輸出先国に設定された最大残留基準値(MRL)に対して輸出を意図する農産品等における農薬残留物濃度の適合を確実にすること、また MRL が設定されていない場合等には必要とされるデータを科学的根拠として示して MRL の設定を申請(インポートトレランス申請)することは、食品安全行政の国際整合に基づく輸出促進のための具体的な方策となる。国際的な観点から見て標準的な MRL の設定あるいはインポートトレランスの申請には、農薬残留物濃度を示すデータ等の他に、規制目的で使用可能な簡易で迅速な分析法の提示が求められる。しかし、これまでのわが国においては、そのような分析法の検証が十分でなかった。そのため、国産農産品等の輸出促進の障壁となる可能性があり解決すべき課題である。

本研究では、国際標準の MRL 設定については国産農産品等の輸出促進に資する研究として、QuEChERS 法の厳密な性能評価、国内残留実態濃度に基づく海外 MRL への適合度の検証について検討した。以下、検討課題ごとに目的を示す。

A-1. QuEChERS 法の厳密な性能評価

近年、農薬残留物の簡易で迅速な分析

法として QuEChERS 法が開発された。QuEChERS とは、Quick(迅速)、Easy(簡単)、Cheap(安価)、Effective(効率的)、Rugged(頑健)、Safe(安全)の混成語であり、農薬残留物の分析に求められる様々な要件を満たす分析法として期待されている。農薬残留物の規制分野において、国際的にも急速に認められつつあり、規制のための分析法としてだけではなく、作物残留試験データの取得にも利用され始めている。

国産農産品の輸出促進の観点からは、国際標準の MRL 設定またインポートトレランスの申請に備え、QuEChERS 法の適用可否を明らかにしておくことが重要である。また国内においても、QuEChERS 法の利用が検討され始めているが、公的に示されてきた従来の分析法(公示分析法)との比較も含めた厳密な性能評価が最重要課題とされている。

現在では、QuEChERS 法は簡易・迅速な分析法の総称となっており、数種類の分析操作の工程が存在し、多様性を生じている。そこで本研究では、QuEChERS 法と呼称される分析法のうち、代表的な方法を対象とし、農薬を投与した結果としての残留物を含む試料(インカード試料)の分析を通じて従来の分析法との比較も行いつつ、厳密な性能評価を行うことを目的とした。

A-2. 残留物実態濃度に基づく海外 MRL への適合度の検証

農業に必要な最小量の農薬の使用が、MRL 設定の前提になる。この最小量の農

薬を使用した結果として農産品に生じる残留物濃度を許容するための指標値が MRL である。農業に必要な農薬の最小量は、その国や地域の気候や病害虫等の発生により異なる。そのため、設定された MRL の値が国により異なる場合もあるが、科学的根拠を示すことで合理性が認められる。

農産品等の輸出を意図する相手国において当該農産品等を対象とする MRL が設定されていた場合には、その MRL への適合を確実にすることが基本となる。しかし、先述のとおり、当該国における農薬等の使用基準や登録が無く、一律設定が背景になる場合には、設定された MRL の値がわが国の農業により達成可能な値に比べ低くなる可能性がある。そのような場合に、わが国の MRL には適合しても、当該国では不適合になる場合も想像される。本研究では、そのように想像される事態が実際に発生する可能性の検証を目的として、国内流通する農産品等の残留濃度データを対象に、海外 MRL への適合度を検証した。

B. 研究方法

B-1. QuEChERS 法の厳密な性能評価

B-1-1. 試薬等

B-1-1-1. 標準品

- ・エトフェンプロックス標準品：純度 99.9%(林純薬工業製)
- ・ジノテフラン標準品：純度 99.8%(富士フィルム和光純薬製)

B-1-1-2. 試薬

- ・アセトン、アセトニトリル：残留農薬試験用(関東化学製)
- ・メタノール：高速液体クロマトグラフ用(関東化学製)
- ・塩化ナトリウム、酢酸アンモニウム：試薬特級(関東化学製)
- ・くえん酸三ナトリウム二水和物、無水硫酸マグネシウム：試薬特級(富士フィルム和光純薬製)

B-1-1-3. 試液の調製

- ・1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム 15.43 g を水に溶解し 200 mL とした。
- ・2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液：1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 2 mL に水を加えて 1000 mL とした。

B-1-1-4. 標準溶液の調製

1) 標準原液の調製

- ・エトフェンプロックス標準原液：エトフェンプロックス標準品 25 mg を精密に量り、50 mL 容全量フラスコに入れた。アセトンを加え、超音波を照射して溶解した後に定容し、これをエトフェンプロックス標準原液(500 mg/L)とした。
- ・ジノテフラン標準原液：ジノテフラン標準品 25 mg を精密に量り、以下上記と同様に調製し、ジノテフラン標準原液(500 mg/L)とした。

2) 添加用混合標準溶液の調製

- ・添加用混合標準溶液(1 mg/L)：標準原液(500 mg/L)1.0 mL を 25 mL 容全量フラス

コに採り、アセトンを加えて定容し、希釈用標準溶液(20 mg/L)を調製した。次いで、希釈用標準溶液(20 mg/L)1.0 mL を 20 mL 容全量フラスコに採り、アセトンを加えて定容した。

・添加用混合標準溶液(5 mg/L)：標準原液(500 mg/L)1.0 mL を 25 mL 容全量フラスコに採り、アセトニトリルを加えて定容し、希釈用標準溶液(20 mg/L)を調製した。次いで、希釈用標準溶液(20 mg/L)2.5 mL を 10 mL 容全量フラスコに採り、アセトニトリルを加えて定容した。

3)検量線用混合標準溶液の調製

表 1 に従って希釈し、測定用混合標準溶液を調製し、その内の一部を検量線用混合標準溶液とした。

B-1-2. 装置

・超遠心粉砕機：ZM-200

[Retsch 製]

・エルビスシェーカー

[スギヤマゲン製]

・高速液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)

機種：LC 部；Nexera X2(LC30-AD)

[島津製作所製]

MS 部；LC/MS-8050

[島津製作所製]

解析ソフト：LabSolutions LCMS

[島津製作所製]

カラム：InertSustain C18(内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm)

[ジーエルサイエンス製]

カラム温度：40℃

B-1-3. 試料の調製

B-1-3-1. 分析用試料(インカード試料及びコントロール試料)の調製

稲の栽培時に農薬を投与し調製した玄米をインカード試料、農薬を投与せず調製した玄米をコントロール試料とした。約 1 kg のインカード試料、及びにコントロール試料を 0.5 mm メッシュを装備した超遠心粉砕機を用いて粉砕することにより、分析用試料を調製した。調製した分析用試料は、-20℃の条件で冷凍保存した。

B-1-3-2. 管理用試料の調製

適正な分析操作等が行われたことを確認する目的から、管理用試料を調製し、併行条件下でインカード試料とともに分析した。管理用試料の調製方法は以下の通りである。

B-1-3-1.に示した方法に従い調製した玄米コントロール試料を、基本分析法の場合には 10.0 g、QuEChERS 法の場合には 5.0 g 分取した後、濃度が 0.1 mg/kg になるようにエトフェンプロックス及びジノテフラン標準品を添加することで、管理用試料を調製した。具体的には、基本分析法の場合には添加用混合標準溶液(1 mg/L)を 1 mL、QuEChERS 法の場合には添加用混合標準溶液(5 mg/L)を 100 μL を、それぞれ量り取った玄米コントロール試料に添加した。

B-1-4. 分析

B-1-4-1. 分析対象化合物

本研究で用いたインカード試料の作成には、オクタノール・水分配係数(logPow)を指標として脂溶性の異なる農薬として選定したエトフェンプロックス(Etofenprox)、及びジノテフラン(Dinotefuran)を用いた。インカード試料の作成方法については、加藤による分担研究報告書を参照のこと。

規制のための残留物として定義されており、農薬投与の結果生じた残留物としてインカード試料に含まれることも予想されたことから、エトフェンプロックス及びジノテフランを分析対象化合物とした。

B-1-4-2. 分析法

B-1-4-2-1. 測定用溶液の調製

1) 公示分析法に基づくエトフェンプロックス分析法(エトフェンプロックス基本分析法)

別添1に示した公示個別分析法:エトフェンプロックス(農産物)が採用している抽出溶媒を変更せず、LC-MS/MSによる測定を前提に以下の分析法を構築し、本研究では使用した。

試料 10.0 g に水 20 mL を加え 2 時間静置した。アセトン 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加え、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、アセトンを加えて正確に 200 mL とした。抽出液を 1 mL 分取し、メタ

ノールで 20 mL に定容した。LC-MS/MS に注入し、B-1-4-2-2.測定条件に従い測定した。

2) 公示分析法に基づくジノテフラン分析法(ジノテフラン基本分析法)

別添2に示した公示個別分析法:ジノテフラン(農産物)が採用している抽出溶媒を変更せず、LC-MS/MSによる測定を前提に以下の分析法を構築し、本研究では使用した。

試料 10.0 g に水 20 mL を加え 2 時間静置した。アセトニトリル 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液をあわせ、アセトニトリルを加えて正確に 200 mL とした。抽出液を 1 mL 分取し、メタノールで 20 mL に定容した。LC-MS/MS に注入し、B-1-4-2-2.測定条件に従い測定した。

3) QuEChERS 法

エトフェンプロックス及びジノテフランを一斉に分析可能な QuEChERS 法として以下を構築し、本研究では使用した。

試料 5.0 g に水 10 g 及びアセトニトリル 10 mL を加え、シェイカーを用いて 250 rpm で 1 分間振とうした。無水硫酸マグネシウム 4 g、塩化ナトリウム 1 g、くえん酸三ナトリウム二水和物 1 g 及びくえん酸水素二ナトリウム 1.5 水和物 0.5 g を加え、250 rpm で 1 分間振とうした。3000 rpm で 5 分間遠心分離し、アセトニトリ

ル層を分取した。抽出液を 0.5 mL 分取し、メタノールで 100 mL に定容した。

B-1-4-2-2. 測定条件

1) エトフェンプロックス測定のための LC-MS/MS 操作条件例

移動相：A 液；2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

B 液；メタノール

A 液：B 液(13：87)

流量：0.2 mL/min

注入量：4 μ L

コリジョンガス：アルゴン

モニターイオン等：表 2 の通り

2) ジノテフラン測定のための LC-MS/MS 操作条件

移動相：A 液；2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

B 液；メタノール

A 液：B 液(20：80)

流量：0.2 mL/min

注入量：2 μ L

コリジョンガス：アルゴン

モニターイオン等：表 2 の通り

B-1-4-2-3. 検量線の作成

分析時ごとに、検量線用混合標準溶液を測定して、各分析対象化合物の重量とピーク面積から、最小二乗法により得た一次回帰式を検量線として用いた。検量線の一例を図 1 及び図 2 に示す。

いずれの検量線についても、決定係数は

≥ 0.999 となった。

B-1-4-3. 濃度の計算

各測定用溶液を LC-MS/MS に注入し計測されたピーク面積から、検量線を用いて各分析対象化合物の重量を逆推定後、分析法と分析対象化合物との組合せごとに、次式に従い試料における濃度を算出した。

1) 基本分析法の場合

公示分析法に基づき構築した基本分析法によるエトフェンプロックス並びにジノテフラン分析時には、下式により試料における濃度を算出した。

・エトフェンプロックス濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量(ng) \times 50 mL/4 μ L \times 200 mL/1 mL \times 1(希釈率) \times 1/10 g

・ジノテフラン濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量(ng) \times 20 mL/2 μ L \times 200 mL/1 mL \times 1(希釈率) \times 1/10 g

2) QuEChERS 法の場合

構築した QuEChERS 法によるエトフェンプロックス並びにジノテフラン分析時には、下式により試料における濃度を算出した。

・エトフェンプロックス濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量(ng) \times 50 mL/4 μ L \times 200 mL/1 mL \times 1(希釈率) \times 1/10 g

・ジノテフラン濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量(ng) \times 20 mL/2 μ L \times 200 mL/1 mL \times 1(希釈率) \times 1/10 g

B-1-4-4. 定量下限値(LOQ)の推定

各分析法の LOQ は、検量線の最下点と

して設計した分析対象化合物の量と、希釈を含む測定用溶液の調製手順から、以下の通り、計算により推定した。

1)基本分析法の LOQ

・エトフェンプロックスについて： $0.0008 \text{ ng} \times 20 \text{ mL} / 4 \text{ } \mu\text{L} \times 200 \text{ mL} / 1 \text{ mL} \times / 10 \text{ g} = 0.08 \text{ mg/kg}$

・ジノテフランについて： $0.0004 \text{ ng} \times 20 \text{ mL} / 2 \text{ } \mu\text{L} \times 200 \text{ mL} / 1 \text{ mL} \times / 10 \text{ g} = 0.08 \text{ mg/kg}$

2) QuEChERS 法の LOQ

・エトフェンプロックスについて： $0.0008 \text{ ng} \times 100 \text{ mL} / 4 \text{ } \mu\text{L} \times 10 \text{ mL} / 0.5 \text{ mL} / 5 \text{ g} = 0.08 \text{ mg/kg}$

・ジノテフランについて： $0.0004 \text{ ng} \times 100 \text{ mL} / 2 \text{ } \mu\text{L} \times 10 \text{ mL} / 0.5 \text{ mL} / 5 \text{ g} = 0.08 \text{ mg/kg}$

B-2. 残留物実態濃度に基づく海外 MRL への適合度の検証

厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課が収集した、食品における農薬残留物検査結果(2013 年～2017 年実施分)から国内で生産された農産品等のデータを抽出し、諸外国が設定する MRL の値と比較した。諸外国が設定する MRL の値は、農林水産省が実施した「輸出環境整備推進事業(主要国・地域の残留農薬基準値調査事業)」報告書、並びに諸外国における残留農薬基準値に関する情報の品目別残留農薬基準値*から引用した。農林水産省の調査事業では、香港、台湾、韓国、中国、シンガポール、マレーシア、インドネシア、タイ、ベトナム、米国、カナダ、オーストラリア、

ニュージーランド、ロシア、アラブ首長国連邦(UAE)、サウジアラビア、欧州連合(EU)、及び国際政府間組織である Codex 委員会が調査対象とされていた。

諸外国による食品規格の策定においても、MRL が設定されることの他に、不検出であることが求められる場合が確認された。しかし、不検出であることを分析により担保するために必要な分析法の検出下限値が不明であったため、各種農産品と当該農薬との組み合わせを精査し、MRL として 0.01 mg/kg 以上の値が発見された場合には 0.005 mg/kg 、 0.01 mg/kg 未満の値が発見された場合にはその $1/2$ の値を検出下限値と想定し解析を進めた。一方の国内で生産された農産品等のデータについては、ND(検出せず)として報告されている場合には、合わせて報告された検出下限値の $1/2$ を取得された農薬残留物濃度として解析に使用した。

本研究では、わが国からの代表的な輸出農産品になる可能性があると考えた米、茶、いちごを対象とした。これら 3 種の農産品に対して実施された検査において取得された農薬残留物データと諸外国が設定する MRL の値を比較した。比較に使用したデータ数は、米について 91,045 件、茶について 11,418 件、いちごについて 63,768 件であった。

*(https://www.maff.go.jp/j/shokusan/export/zannou_kisei.html)

C. D. 結果及び考察

CD-1. QuEChERS 法の厳密な性能評価

CD-1-1. 結果

①基本分析法の構築

別添 1 並びに別添 2 に示したとおり、わが国において公的に示されている農産品中のエトフェンプロックス及びジノテフランを対象とする分析法は、抽出に使用する溶媒がアセトンとアセトニトリルに異なっている。また、測定系は HPLC-UV を基本としている。本研究における公的に示された分析法の役割は、QuEChERS 法の性能を評価するための基準を与えることである。そのため、測定系には、QuEChERS 法と共通させるために LC-MS/MS を使用することとした。さらに、エトフェンプロックスとジノテフランの抽出に同一溶媒を使用することで、両化合物を一斉分析可能な基本分析法の構築について検討した。

本報告書の方法 B-1-4-2-1 に示したエトフェンプロックスとジノテフランの基本分析法は、アセトンとアセトニトリルのいずれを抽出溶媒として使用するかの点において異なっている。エトフェンプロックス基本分析法ではアセトンを使用し、ジノテフラン基本分析法ではアセトニトリルを使用する。抽出に用いるこれら 2 つの溶媒による分析値への影響を明らかにすることを通じて、基本分析法を統一可能かについて検討した。具体的には 2 つの溶媒のそれぞれを用いて、玄米インカード試料を対象にエトフェンプロックスとジノテフランの併行分析(n=6)を行い、得られた分析値を比較した。エトフェンプロックスの

分析結果を表 3 に、ジノテフランの分析結果を表 4 に示す。

玄米インカード試料に含まれるエトフェンプロックス並びにジノテフランの真の量は不明であるため、真度については考察しない。異なる溶媒を用いて得られる分析値を比較すると、エトフェンプロックス分析値の平均値は、アセトンを用いた場合に 0.177 mg/kg であり、アセトニトリルを用いた場合に 0.174 mg/kg であった。同様にジノテフラン分析値の平均値を比較すると、アセトンを用いた場合に 0.322 mg/kg であり、アセトニトリルを用いた場合に 0.318 mg/kg であった。溶媒ごとに得られた分析値を一群として検定 (unpaired t-test) した結果、有意差は認められなかった(両側 95%信頼水準)。以上の結果に基づき、玄米中のエトフェンプロックスとジノテフランは、アセトンとアセトニトリルいずれの溶媒を用いても分析可能であり、有意差のない分析値が得られると考えた。しかし、アセトニトリルを用いた場合にアセトンを用いた場合に比べて、得られる分析値のばらつきが、2 つの分析対象化合物に共通してわずかに大きくなった。また、単一の農薬残留物を対象とした分析法における抽出には、一般的にアセトンが用いられる。以上を考慮し、抽出溶媒にはアセトンを選択し、QuEChERS 法と比較するための基本分析法とした。基本分析法のフローを図 5 に示す。なお、表 3 及び表 4 により示された併行精度(エトフェンプロックスの場合に 2.6%、ジノテフランの場合に

2.2%)は、公的な検査等に用いられる分析法に一般的に要求される性能を満たしている。本研究においては再現条件下での分析は計画されていないため、再現精度を証明していないが、上記の推定された併行精度からは、再現精度の要求も十分に満たすことが予想される。

②QuEChERS 法における振とう時間

本研究において使用した QuEChERS 法は、QuEChERS 法と呼称される多様性のある分析法の一群の中で、より標準的な内容であるため、2008 年に発表された EU 法：EN 15662:2008 (Foods of plant origin- Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE- QuEChERS-method)を基に構築した。EU 法では、分析試料に適宜水を加え、アセトニトリルを加えた後の振とう時間は 1 分間とされている。しかし、試料から残留物が容易に抽出されない場合には、振とう時間を 20 分程度まで延長するとの記載もある。そこで、振とう時間が分析値に与える影響について検討した。

玄米インカード試料にアセトンを加え、振とう時間を 1 分間、10 分間、そして 20 分間として抽出を行い、その後分析法に従い操作して分析値を得た(n=2)。表 5 に示した結果の通り、エトフェンプロックス及びジノテフランともに、振とう時間が長いほど分析値が大きくなるといった変化や違いは認められなかった。この結果を踏ま

え、振とう時間による分析値への明らかな影響はないと判断し、本研究において使用する QuEChERS 法においては、振とう時間を 1 分間とすることとした。QuEChERS 法のフローを、基本分析法のフローとともに図 3 に示す。また、基本分析法と QuEChERS 法のそれぞれにより得られたエトフェンプロックスとジノテフランのクロマトグラムの一例を図 4 及び図 5 に示す。

③管理用試料の分析

玄米インカード試料の分析時に、分析値の品質保証を目的として管理用試料を分析した。管理用試料は、B-1-3-1.に示した方法に従い調製した玄米コントロール試料を、基本分析法の場合には 10.0 g、QuEChERS 法の場合には 5.0 g 分取した後、濃度が 0.1 mg/kg になるようにエトフェンプロックス及びジノテフラン標準品を添加することで調製した。調製した添加試料をインカード試料と同一の分析条件下で、基本分析法、及び QuEChERS 法のそれぞれにより併行分析(n=6)した。得られた分析結果を、エトフェンプロックスとジノテフランごとにまとめ、表 6 及び表 7 に示す。

添加濃度は、わが国において設定されている玄米を対象としたエトフェンプロックスとジノテフランの MRL が、それぞれ 0.5 mg/kg と 2 mg/kg であること、及び基本分析法の構築検討時にインカード試料から得られた濃度(表 3 及び表 4)を考慮し、

それら濃度の分析時に異常があれば検出可能な濃度として設定した。

エトフェンプロックス分析値の平均値と RSD%は、基本分析法を用いた場合にはそれぞれ 0.11 mg/kg と 1.6%であり、QuEChERS 法を用いた場合にはそれぞれ 0.098 mg/kg と 4.0%であった。いずれの方法を用いた場合にも、回収率は 70-110%の範囲に含まれており、分析が正常に行われたことが確認された。QuEChERS 法に比べ基本分析法による回収率が一定して高かったが、その原因は不明である。

ジノテフラン分析値の平均値と RSD%は、基本分析法を用いた場合にはそれぞれ 0.095 mg/kg と 3.6%であり、QuEChERS 法を用いた場合にはそれぞれ 0.095 mg/kg と 5.7%であった。いずれの方法を用いた場合にも、回収率は 70-110%の範囲に含まれており、分析が正常に行われたことが確認された。

④インカード試料の凍結保存安定性

管理用試料を、インカード試料と同一の条件(-20°C)で凍結保存し、0 日目及び 100 日目に、基本分析法を用いて併行分析(n=2)した。表 8 に示した通り、エトフェンプロックス及びジノテフランともに、0 日目と 100 日目に実施した併行分析の結果に、異常なばらつきは認められなかった。また 0 日目の分析値に対する 100 日目の分析値の割合(残存率%)を計算した結果、エトフェンプロックスとジノテフランのそれぞれについて 98%及び 99%であった。

これらの結果により、エトフェンプロックスとジノテフランは、凍結保存された試料において最低 100 日間は安定であることが確認された。

⑤インカード試料の分析通じた QuEChERS 法の性能評価

まず基本分析法を用いて玄米インカード試料を分析し、その結果に基づき農薬残留物濃度の値付けをした。次いで、QuEChERS 法により得た分析値と値付けした値とを比較することで、QuEChERS 法の性能評価を試みた。なお、本分析は試料調製後 96 日間凍結保存された試料を用いて行われており、先に示された凍結保存安定性の結果から、試料におけるエトフェンプロックス及びジノテフランの安定性への懸念はない。

玄米インカード試料を基本分析法、及び QuEChERS 法のそれぞれにより併行分析(n=6)した。得られた分析結果を、エトフェンプロックスとジノテフランごとにまとめ表 9 及び表 10 に示す。

玄米インカード試料から得られたエトフェンプロックスの分析値は、基本分析法を用いた場合には 0.187 mg/kg ~ 0.201 mg/kg であり平均値は 0.19 mg/kg、QuEChERS 法を用いた場合には 0.161 mg/kg ~ 0.170 mg/kg であり平均値は 0.16 mg/kg であった。QuEChERS 法を用いて得られた分析値は、基本分析法を用いて値付けされた値に比べて低く、unpaired t-test を用いた検定により、95%信頼水準で有意差が認められた(P<0.01)。先に述べたとおり、

基本分析法を用いた管理用試料の分析において回収率が高めの値となったことから、それら回収率の値を用いてインカード試料から得られた分析値を補正した。基本分析法と QuEChERS 法により得られた分析値の補正值は、それぞれ 0.176 mg/kg～0.189 mg/kg(平均値; 0.181 mg/kg)、0.164 mg/kg～0.173 mg/kg(平均値; 0.167 mg/kg)となった。これら補正值についても同様に検定した結果、有意差が認められた。基本分析法により値付けされた値を真値とすると、QuEChERS 法の真度は 85%と推定され、わが国の検査において使用される分析法の性能規準を示した「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」(平成 19 年 11 月 15 日付け食安発第 1115001 号; 一部改正 平成 22 年 12 月 24 日食安発 1224 第 1 号)に示された目標値(70～120%)を満たすことから、“妥当”な分析法であるということはあるが、QuEChERS 法を用いた場合の分析値が基本分析法に比べて低値になる確率は極めて高いと考えられる。

玄米インカード試料から得られたジノテフランの分析値は、基本分析法を用いた場合には 0.321 mg/kg～0.349 mg/kg であり平均値は 0.34 mg/kg、QuEChERS 法を用いた場合には 0.323 mg/kg～0.347 mg/kg であり平均値は 0.34 mg/kg であった。これらの分析値を対象に、unpaired t-test を用いた検定を行った結果、95%信頼水準で有意差は認められなかった。以上の結果から、エトフェンプロックスの場合とは異なり、

ジノテフランに関しては、QuEChERS 法により、基本分析法と有意差のない分析値を得ることが可能であることが強く示唆された。

エトフェンプロックス及びジノテフランのオクタノール・水分配係数(logPow)はそれぞれ 6.9 及び -0.549、水溶解度は 0.0225 mg/L(20～25℃)及び 3.98×10^4 mg/L(20～25℃)であり、エトフェンプロックスは脂溶性が高く、ジノテフランは水溶性が高い。本研究によって得られた結果を基に考察すれば、玄米の分析試料に含まれる脂溶性が高い農薬残留物を対象に QuEChERS 法により得られる分析値は、これまでに公的に示されてきた一般的な分析法により得られる分析値に比べ、一定の割合で低くなると推測することも可能である。しかし、あくまで、単一試料に含まれる 2 種類の残留物を分析した結果を比較し考察したに過ぎず、明確な結論として一般化することはできない。QuEChERS 法の適用にあたり、分析用試料の粒径をより小さくする調製の方法や、水を試料に添加した後の静置時間の延長についての検討など、技術的な課題もある。以上を踏まえ、QuEChERS 法の性能に影響を与える要素の特定や、多様な農産物と農薬残留物との組合せについて性能を評価するためのさらなる検討が必要である。

CD-2. 残留物実態濃度に基づく海外 MRL への適合度の検証

本研究では、わが国からの代表的な輸出

農産品になる可能性があると考えた米、茶、いちごを対象とし、これら3種の農産品に対して実施された検査において取得された農薬残留物データと諸外国が設定するMRLの値を比較した。

解析の結果、諸外国には米を対象に286種の農薬のMRLが設定されており、そのうち2013年～2017年にかけて実施された検査によって、国内産の米を対象に残留物データが取得された農薬は233種、取得されなかった農薬は53種であることがわかった。わが国においては、米(玄米)と精米を区別してMRLが設定されている。これに対し、諸外国におけるMRL設定では、玄米と精米を区別する場合と、米(rice)として区別しない場合とがあった。そこで、このMRL設定の違いを考慮するために、国内産の米から取得された農薬残留物データを玄米と精米とに区別した上で、諸外国が設定するMRLと比較した。玄米から取得された農薬残留物データと玄米を対象とするMRL、精米から取得された農薬残留物データと精米を対象とするMRL、両者を合わせた農薬残留物データと米(玄米・精米の区別なし)を対象とするMRLとを、それぞれ比較した。

諸外国には茶を対象に205種の農薬のMRLが設定されており、そのうち検査によって残留物データが取得された農薬は135種、取得されなかった農薬は70種であることがわかった。いちごに関しては、287種の農薬にMRLの設定があり、そのうち検査によって残留物データが取得さ

れた農薬は235種、取得されなかった農薬は52種であることがわかった。

米、茶、いちごから検出された農薬残留物の濃度が、諸外国が設定するMRLの値を超過した件数が10以上となった農薬を表11に示す。

精米からは、諸外国が設定するMRLの値を超過する濃度で農薬残留物は検出されず、超過する濃度の残留物は全て玄米から検出された。残留物濃度がMRLの値を超過した農薬について、わが国が設定しているMRLを調査すると、その範囲は0.5 mg/kg～3 mg/kgであり、いわゆる一律基準とされる0.01 mg/kgに比べると最大で300倍に相当する高い値であった(表11)。一方、該当する農薬について諸外国が設定しているMRLを参照すると、例えばCodex委員会はMRL(Codex MRL; CXL)として、エトフェンプロックスに0.01 mg/kg、クロチアニジンに0.5 mg/kg、ジノテフランに8 mg/kgを設定している。CXLに準じてMRLを設定している国がある一方で、CXLの値に比べてもより低い値をMRLとして設定している、あるいは不検出を求めている国もある。CXLが8 mg/kgに設定されているジノテフランを例とすれば、調査対象とする国により、MRLとして0.1 mg/kg～1 mg/kgの値が設定されている他に、不検出が求められている場合もあることがわかった。他の農薬について、さらに低濃度のMRLが設定されている場合もある。そのような場合には、わが国において設定されているMRLの値との乖離はさら

に大きくなり、食品衛生法に基づく検査では適合と判定されるものの、諸外国における検査では不適合となる可能性が高いと考えられる。

茶についても、解析結果を同様に考察する。わが国において各種農薬を対象に設定されている MRL の値は、10 mg/kg～80 mg/kg の範囲にある。表 11 に示した農薬のうち、エトキサゾール、トルフェンピラド、フルフェノクスロンの CXL は、それぞれ 15 mg/kg、30 mg/kg、20 mg/kg に設定されており、調査対象とした国の中には、これら CXL の値をそのまま採用している国も、一律基準に相当する濃度を MRL の値として設定している国もある。CXL が設定されていない農薬については一般に、さらに低濃度の MRL が設定されている。検出された残留物の濃度が諸外国において設定されている MRL の値を超過する件数が多いことが示されたが、これはわが国において、高値の MRL が設定されている農薬が多数あることを反映した結果であると考えられる。

いちごを対象とした解析により、非常に多くの農薬残留物データが諸外国において設定されている MRL の値を超過することがわかった。MRL の値の超過件数が 10 件以上となった農薬は 16 種確認されたが、わが国においてそれら農薬を対象に設定されている MRL の値は 0.4 mg/kg から 10 mg/kg であった。諸外国が設定している MRL の例として CXL のいくつかを挙げると、アセタミプリドには 0.5 mg/kg、イ

ミダクロプリドには 0.5 mg/kg、ジフェノコナゾールには 2 mg/kg、チアクロプリドには 1 mg/kg、フェナリモルには 1 mg/kg が設定されている。その他諸外国では、MRL の値を 0.01 mg/kg とする場合あるいは不検出を求める場合も多い。いちごに関しては、傷まないようにするためにも複数の種類の農薬を適正に使用し栽培した結果として妥当な残留物濃度が、MRL として設定されている値を超過してしまう可能性が高いと考えられる。

上記の結果と考察は、輸出することを想定していないあくまで国内流通している国産品の検査を通じて取得された農薬残留物データと諸外国が設定する MRL の値との比較に基づく。国内流通している農産品における残留物濃度を国内基準値すなわち、わが国において設定されている MRL の値と比較し、適合を判定することを目的とする検査において取得された農薬残留物データであるため、取得に関する分析の保証も検査の目的に相応している。そのため、わが国における MRL が高値に設定されている場合には、分析法の検出下限値もそれに応じて高値でしか保証されていない場合がある。そのような場合、不検出と報告されていたとしてもそれは保証された高値の検出下限を指標としており、実際の濃度は不明である。そのため、諸外国が設定する MRL の値との比較においては、検出下限値として保証されている濃度に応じて、判定が変化する可能性がある。例えば、わが国においては、玄米を対

象とした γ -BHCのMRLとして0.3 mg/kgが設定されているため、一律基準である0.01 mg/kgよりも高い濃度でしか検出下限を保証していない分析法により検査される場合もある。しかし、諸外国では、MRLの値に0.01 mg/kgが設定されることや、不検出が求められることもある。当然のことであるが、これら規制上の指標設定に対し、上記の検出下限値しか保証しない分析法により取得した結果に基づき適合

判定することは適当ではない。

E. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

渡邊敬浩, 松田りえ子, 畝山智香子: 国内農薬残留検査データと海外 MRL の比較, 第 43 回残留農薬分析研究会, 2021, 11.06

表-1 検量線用混合標準溶液の調製

名称	調製濃度 (mg/L)	使用溶液	使用量 (mL)	定容量 (mL)
標準溶液A	1	希釈用標準溶液 20 mg/L	1	20
標準溶液B	0.05	標準溶液A	1	20
標準溶液C	0.01	標準溶液B	4	20
標準溶液D	0.006	標準溶液C	6	10
標準溶液E	0.004	標準溶液C	4	10
標準溶液F	0.001	標準溶液C	1	10
標準溶液G	0.0008	標準溶液E	5	25
標準溶液H	0.0006	標準溶液D	1	10
標準溶液I	0.0004	標準溶液E	1	10

[調製溶媒、A:アセトン、B~J:メタノール]

標準溶液 F~J を検量線用混合標準溶液として使用した。

表2 イオン化法、モニターイオン、Q1 Pre Bias、コリジョンエネルギー(CE)及び保持時間の目安

	イオン化法	プレカーサーイオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (<i>m/z</i>)	Q1 Pre Bias (V)	CE (eV)	保持時間の目安(分)
エトフェンプロックス	ESI (+)	394	177	-14	-16	11.1
ジノテフラン	ESI (+)	203	113	-14	-12	4.6

表3 基本分析法に用いる溶媒による分析値への影響 (エトフェンプロックス)

Repeat	分析値 (mg/kg)	
	アセトン	アセトニトリル
1	0.1814	0.1733
2	0.1796	0.1696
3	0.1751	0.1618
4	0.1732	0.1689
5	0.1718	0.1725
6	0.1827	0.1951
Mean	0.177	0.174
SD	0.0045	0.011
RSD%	2.6	6.5

表4 基本分析法に用いる溶媒による分析値への影響 (ジノテフラン)

Repeat	分析値 (mg/kg)	
	アセトン	アセトニトリル
1	0.3278	0.3320
2	0.3286	0.3126
3	0.3275	0.3156
4	0.3158	0.3104
5	0.3126	0.3062
6	0.3170	0.3334
Mean	0.322	0.318
SD	0.0072	0.012
RSD%	2.2	3.6

表 5 QuEChERS 法における振とう時間の分析値への影響

振とう時間	分析値 (mg/kg)		
	エトフェンプロックス	ジノテフラン	
1分間	Repeat1	0.166	0.333
	Repeat2	0.165	0.322
	平均	0.17	0.33
10分間	Repeat1	0.162	0.320
	Repeat2	0.159	0.323
	平均	0.16	0.32
20分間	Repeat1	0.165	0.336
	Repeat2	0.161	0.338
	平均	0.16	0.34

表 6 管理用試料の併行分析結果 (エトフェンプロックス)

	分析結果			
	基本分析法		QuEChERS法	
	分析値 mg/kg	回収率 %	分析値 mg/kg	回収率 %
Repeat 1	0.1063	106	0.1004	100
Repeat 2	0.1072	107	0.09559	96
Repeat 3	0.1057	106	0.09608	96
Repeat 4	0.1061	106	0.09641	96
Repeat 5	0.1039	104	0.09625	96
Repeat 6	0.1090	109	0.1057	106
Mean	0.11		0.10	
SD	0.0017		0.0040	
RSD(%)	1.6		4.0	

表7 管理用試料の併行分析結果 (ジノテフラン)

	分析結果			
	基本分析法		QuEChERS法	
	分析値 mg/kg	回収率 %	分析値 mg/kg	回収率 %
Repeat 1	0.09762	98	0.0997	100
Repeat 2	0.09234	92	0.08888	89
Repeat 3	0.08918	89	0.09198	92
Repeat 4	0.09592	96	0.09444	94
Repeat 5	0.09484	95	0.09252	93
Repeat 6	0.09804	98	0.1037	104
Mean	0.09		0.10	
SD	0.0034		0.0055	
RSD(%)	3.6		5.8	

表8 凍結保存安定性

保存日数	Repeat	エトフェンプロックス		ジノテフラン	
		分析値(mg/kg)	残存率(%)	分析値(mg/kg)	残存率(%)
0日	1	0.1030		0.09262	
	2	0.1031		0.09314	
	Mean	0.1031		0.09288	
100日	1	0.1016		0.09170	
	2	0.1010		0.09224	
	Mean	0.1013	98	0.09197	99

表9 インカード試料の併行分析結果 (エトフェンプロックス)

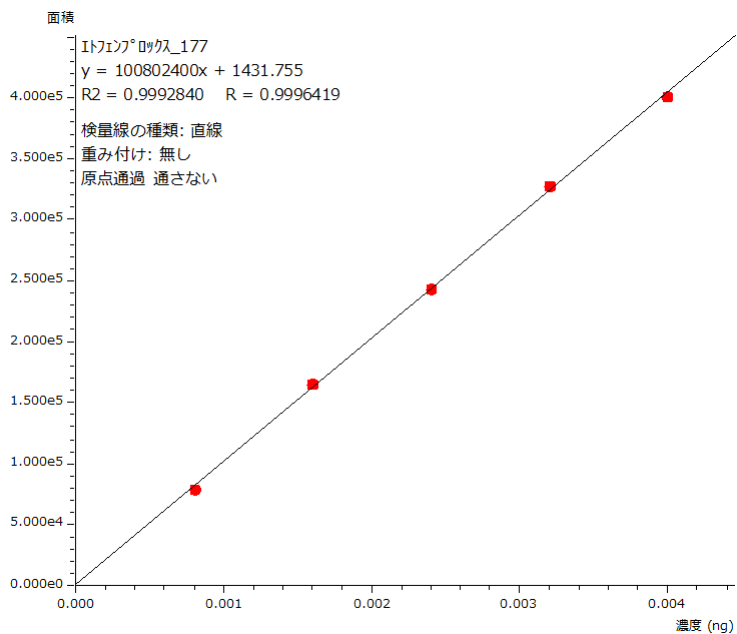
Repeat	分析結果 mg/kg	
	基本分析法	QuEChERS法
1	0.1865	0.1606
2	0.2008	0.1655
3	0.1913	0.1620
4	0.1992	0.1615
5	0.1871	0.1612
6	0.1874	0.1695
Mean	0.19	0.16
SD	0.0064	0.0035
RSD(%)	3.3	2.1

表10 インカード試料の併行分析結果 (ジノテフラン)

Repeat	分析結果 mg/kg	
	基本分析法	QuEChERS法
1	0.3441	0.3420
2	0.3212	0.3364
3	0.3410	0.3228
4	0.3264	0.3348
5	0.3485	0.3383
6	0.3335	0.3466
Mean	0.34	0.34
SD	0.0106	0.0081
RSD(%)	3.2	2.4

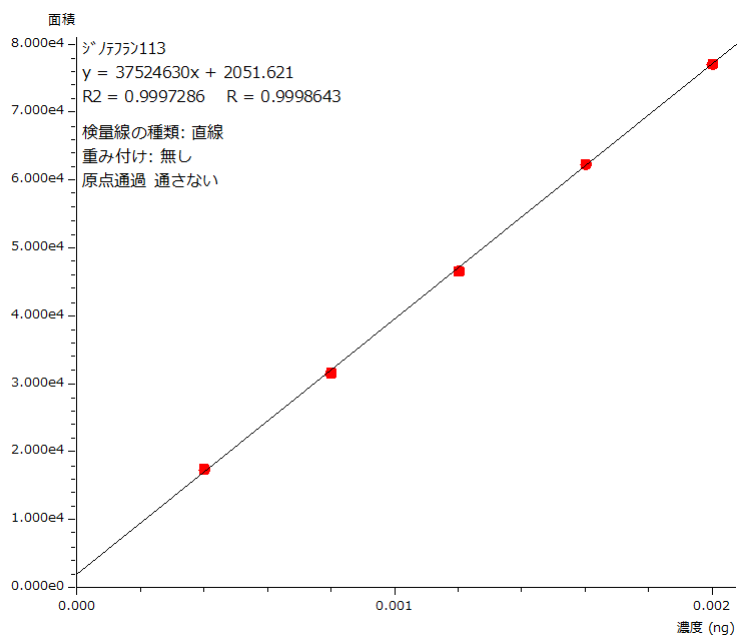
表 11 検査により検出された農薬残留物濃度が、諸外国が設定する MRL の値を超過した件数が 10 以上となった農薬とわが国の MRL

米	わが国の MRL (mg/kg)	茶	わが国の MRL (mg/kg)	いちご	わが国の MRL (mg/kg)
エトフェンプロックス	0.5	エトキサゾール	15	アセタミプリド	3
クロチアニジン	1	クロルフェナピル	40	イミダクロプリド	0.4
ジノテフラン	2	シラフルオフエン	80	エトキサゾール	0.5
トリシクラゾール	3	テブコナゾール	50	クレソキシムメチル	5
フェリムゾン	2	トルフェンピラド	20	ジフェノコナゾール	2
フサライド	1	ピリプロキシフェン	15	シフルフェナミド	0.7
フルトラニル	2	ピリミホスメチル	10	シメコナゾール	3
		フルフェノクスロン	15	チアクロプリド	5
		メトキシフェノジド	20	テトラジホン	1
		ルフェヌロン	10	テブフェンピラド	1
				トリフルミゾール	1
				フェナリモル	1
				フルフェノクスロン	0.5
				プロシミドン	5
				メバニピリム	10
				ルフェヌロン	1



濃度 (重量 : ng)	面積値
0.004	401018
0.0032	327781
0.0024	243449
0.0016	165684
0.0008	78857

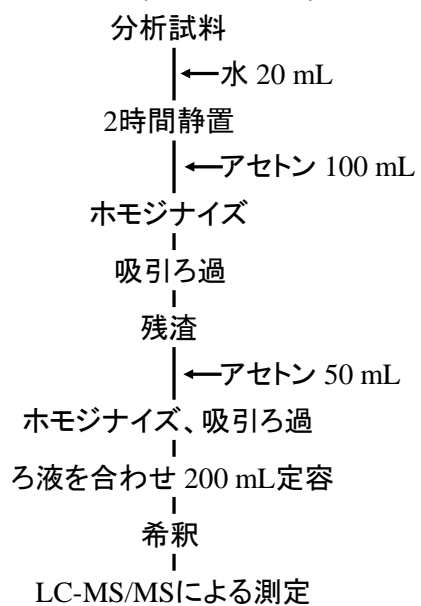
図 1 エトフェン[®]ロックス検量線の一例



濃度 (重量 : ng)	面積値
0.002	77218
0.0016	62320
0.0012	46734
0.0008	31611
0.0004	17523

図 2 ジノテフラン[®]検量線の一例

公示分析法 (基本分析法)



QuEChERS法

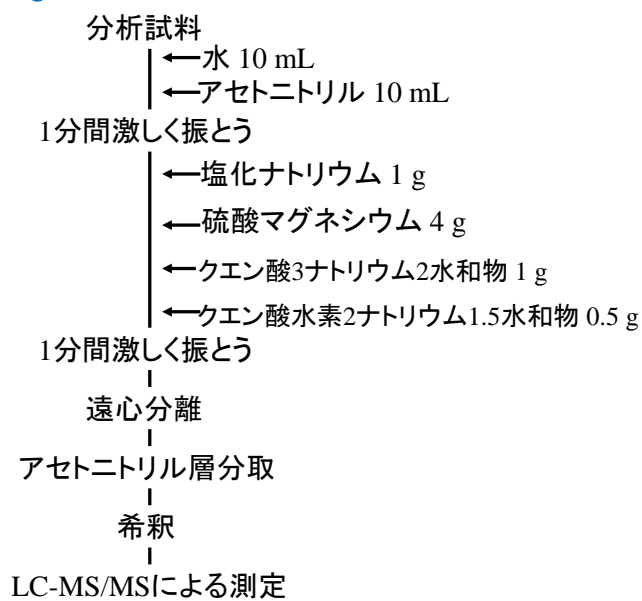
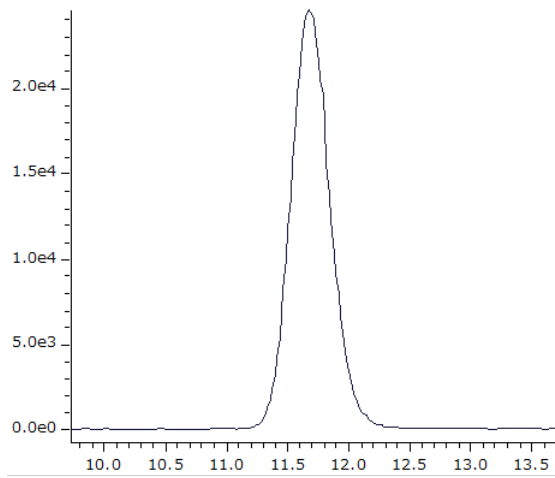


図3 本研究において比較した2つの分析法

標準溶液 0.001 mg/L

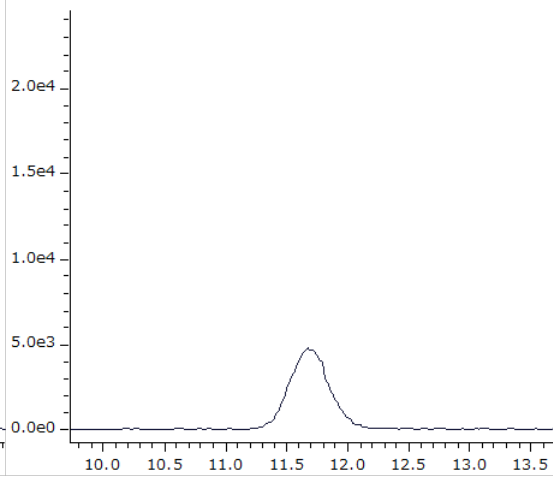
Q 394.25>177.35 (+)



標準溶液 0.0002 mg/L

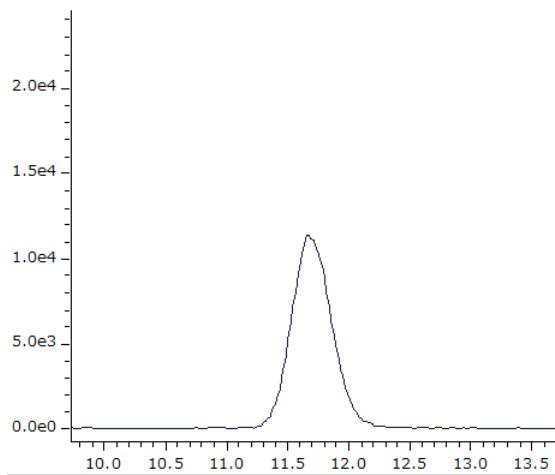
2.46e4 Q 394.25>177.35 (+)

4.77e3



基本分析法

Q 394.25>177.35 (+)



QuEChERS 法

1.14e4 Q 394.25>177.35 (+)

1.02e4

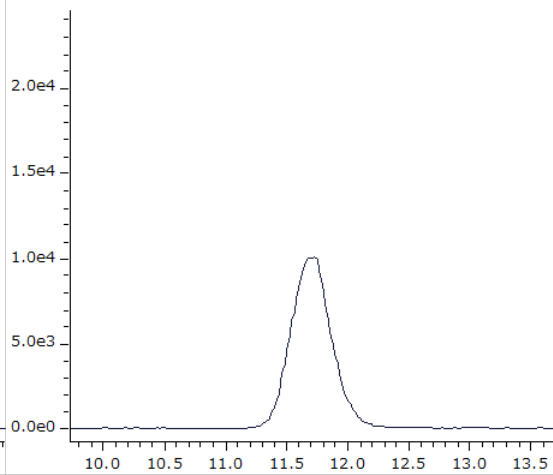
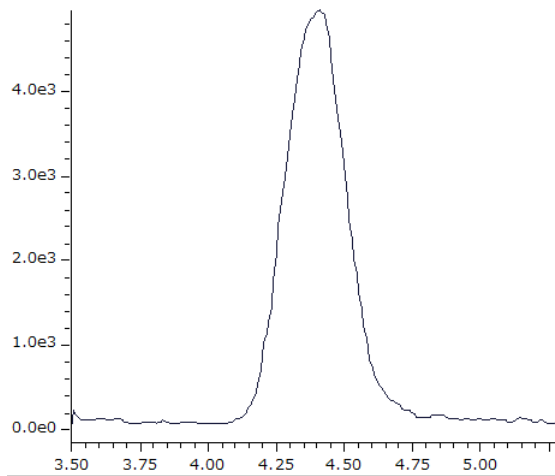


図4 エトフェンプロックスのクロマトグラムの一例

標準溶液 0.001 mg/L

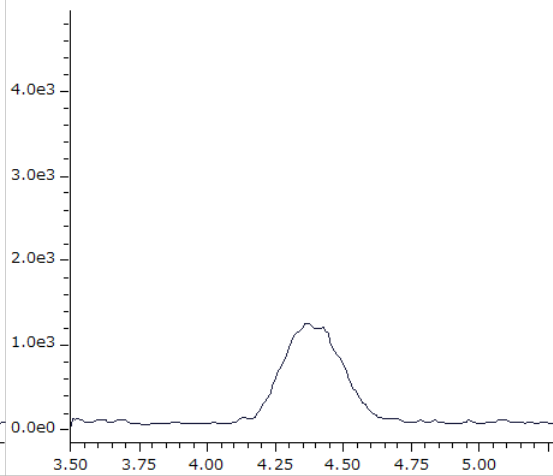
Q 203.11>113.25 (+)



標準溶液 0.0002 mg/L

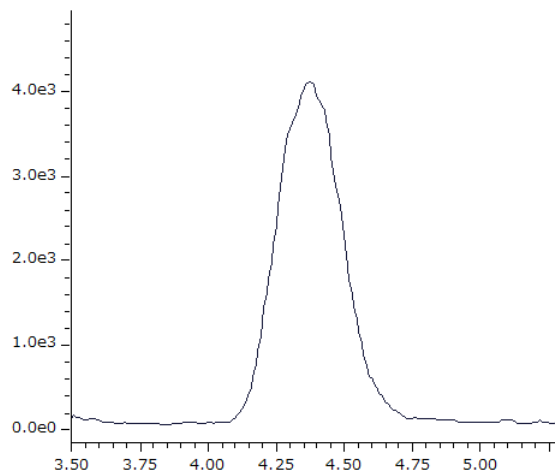
4.96e3 Q 203.11>113.25 (+)

1.26e3



基本分析法

Q 203.11>113.25 (+)



QuEChERS 法

4.12e3 Q 203.11>113.25 (+)

4.22e3

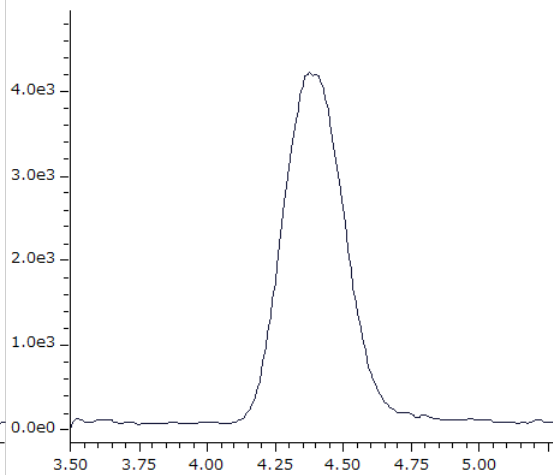


図5 ジノテフランのクロマトグラムの一例

エトフェンプロックス試験法

1. 分析対象化合物

エトフェンプロックス

2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフを用いる。

3. 試薬、試液

総則の 3 に示すものを用いる。

4. 標準品

エトフェンプロックス 本品はエトフェンプロックス 99%以上を含む。

融点 本品の融点は 36~38° である。

5. 試験溶液の調製

a 抽出法

(1) 穀類、豆類及び種実類の場合

検体を 420 μm の標準網ふるいを通るように粉碎した後、その 10.0 g を量り採り、水 20 mL を加え 2 時間放置する。

これにアセトン 100 mL を加え 3 分間細砕した後、ケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採りアセトン 50 mL を加え、3 分間細砕した後、上記と同様に操作してろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、40°C以下で約 30ml に濃縮する。これをあらかじめ 10%塩化ナトリウム溶液 100 mL を入れた 300 mL の分液漏斗に移す。n-ヘキサン 100ml を用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせる。振とう機を用いて 5 分間激しく振り混ぜた後静置し、n-ヘキサン層を 300 mL の三角フラスコに移す。水層に n-ヘキサン 50 mL を加え、上記と同様に操作して n-ヘキサン層を上記の三角フラスコに合わせる。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら 15 分間放置した後、すり合わせ減圧濃縮器中にろ過する。次いで n-ヘキサン 20 mL を用いて三角フラスコを洗いその洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を 2 回繰り返す。両洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、40°C以下で n-ヘキサンを除去する。この残留物に n-ヘキサン 30 mL を加え 100 mL の分液漏斗に移す。これに n-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間激しく振り混ぜた後静置し、アセトニトリル層をすり合わせ減圧濃縮器中に移す。n-ヘキサン層に n-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、上記と同様の操作を 2 回繰り返し、アセトニトリル層をその減圧濃縮器中に合わせ 40°C以下でアセトニトリルを除去する。この残留物に n-ヘキサン 5 mL を加えて溶かす。

(2) 果実、野菜、抹茶及びホップの場合

果実及び野菜の場合は、検体約 1 kg を精密に量り、必要に応じ適量の水を量つて加え細

切均一化した後、検体 20.0 g に相当する量を量り採る。

抹茶の場合は、検体 5.00 g を量り採り、水 20 mL を加えて 2 時間放置する。

ホップの場合は細切均一化した後、検体 5.00 g を量り採り、水 20 mL を加えて 2 時間放置する。

これにアセトン 100 mL を加え 3 分間細砕した後、ケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン 50 mL を加え、3 分間細砕した後、上記と同様に操作してろ液をその減圧濃縮器中に合わせ 40°C 以下で約 30 mL に濃縮する。これをあらかじめ 10% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を入れた 300 mL の分液漏斗に移す。n-ヘキサン 100 mL を用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせる。振とう機を用いて 5 分間激しく振り混ぜた後静置し、n-ヘキサン層を 300 mL の三角フラスコに移す。水層に n-ヘキサン 50 mL を加え上記と同様に操作して、n-ヘキサン層を上記の三角フラスコに合わせる。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら 15 分間放置した後すり合わせ減圧濃縮器中にろ過する。次いで n-ヘキサン 20 mL を用いて三角フラスコを洗いその洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を 2 回繰り返す。両洗液をその減圧濃縮器中に合わせ 40°C 以下で n-ヘキサンを除去する。この残留物に n-ヘキサン 5 mL を加えて溶かす。

(3) 抹茶以外の茶の場合

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 360 mL を 500 mL の三角フラスコに移す。これにアセトン 100 mL 及び飽和酢酸鉛溶液 2 mL を加え室温で 1 時間放置した後、ケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過し、ろ液を 1,000 mL の分液漏斗に移す。次いでアセトン 50 mL を用いてろ紙上の残留物を洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせる。これに塩化ナトリウム 30 g 及び n-ヘキサン 100 mL を加え 5 分間振り混ぜた後静置し、n-ヘキサン層を 300 mL の三角フラスコに移す。水層に n-ヘキサン 100 mL を加え、上記と同様に操作して、n-ヘキサン層を上記の三角フラスコに合わせる。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え時々振り混ぜながら 15 分間放置した後、すり合わせ減圧濃縮器中にろ過する。次いで n-ヘキサン 20 mL を用いて三角フラスコを洗いその洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を 2 回繰り返す。両洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、40°C 以下で n-ヘキサンを除去する。この残留物に n-ヘキサン 5 mL を加えて溶かす。

b 精製法

内径 15 mm、長さ 300 mm のクロマトグラフ管に、カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム 5 g を n-ヘキサンに懸濁したもの、次いでその上に無水硫酸ナトリウム約 5 g を入れカラムの上端に少量の n-ヘキサンが残る程度まで n-ヘキサンを流出させる。このカラムに a 抽出法で得られた溶液を注入した後、エーテル及び n-ヘキサンの混液(2 : 98)30 mL を注入し流出液は捨てる。次いでエーテル及び n-ヘキサンの混液(5 : 95)50 mL を注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り 40°C 以下でエーテル及び n-ヘキサンを除去する。この残留物にアセトニトリルを加えて溶かし正確に 2 mL とした後、孔径 0.5 µm のメンブランフィルターを用いてろ過しこれを試験溶液とする。

6. 操作法

a 定性試験

次の操作条件で試験を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。

操作条件

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径 5 μm)を用いる。

クロマトグラフ管 内径 4.6 mm、長さ 150 mm のステンレス管を用いる。

カラム温度 40°C

検出器 波長 225 nm で操作する。

移動相 アセトニトリル及び水の混液(3 : 1)を用いる。エトフェンプロックスが約 10 分で流出する流速に調整する。

b 定量試験

a 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

7. 定量限界

0.02 mg/kg(茶にあっては 0.1 mg/kg)

8. 留意事項

なし

9. 参考文献

なし

10. 類型

A

ジノテフラン試験法(農産物)

1. 分析対象化合物

ジノテフラン

2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ(HPLC-UV)

液体クロマトグラフ・質量分析計(LC/MS)

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

ジノテフラン標準品 本品はジノテフラン 99%以上を含み、融点は 107.5°Cである。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

穀類、豆類及び種実類の場合は試料 10.0 g に水 20 mL を加え、2 時間放置する。

果実、野菜及びハーブの場合は試料 20.0 g を量り採る。

茶の場合は試料 5.00 g に水 20 mL を加え、2 時間放置する。

これにアセトニトリル 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物に、アセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、アセトニトリルを加え正確に 200 mL とする。この 50 mL(茶の場合は 10 mL)を 40°C以下で約 5 mL まで濃縮する。

2) 精製

(1) 多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー

1)で得られた溶液に水 10 mL を加え、多孔性ケイソウ土カラム(20 mL 保持用)に流し入れ、10 分間放置する。n-ヘキサン 100 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで酢酸エチル 200 mL を注入し、溶出液を 40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル 5 mL を加えて溶かす。

(2) グラファイトカーボンカラムクロマトグラフィー

グラファイトカーボンミニカラム(500 mg)に酢酸エチル 5 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに(1)で得られた溶液を注入した後、酢酸エチル 15 mL を注入する。全溶出液を 40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル 5 mL を加えて溶かす。

(3) 中性アルミナカラムクロマトグラフィー

中性アルミナミニカラム(1,710 mg)に酢酸エチル 5 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに(2)で得られた溶液を注入した後、酢酸エチル 15 mL を注入し、流出液は捨てる。次いでアセトン 20 mL を注入し、溶出液を 40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を水に溶解し、穀類、豆類、種実類及び茶の場合は正確に 1 mL、果実、野菜及びハーブの場合は正確に 2 mL としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

ジノテフラン標準品の 0.025～0.5 mg/L 水溶液を数点調製し、それぞれ 40 μ L を HPLC に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液 40 μ L を HPLC に注入し、5 の検量線でジノテフランの含量を求める。

7. 確認試験

LC/MS により確認する。

8. 測定条件

1) HPLC

検出器：UV(波長 270 nm)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径 3～5 μ m)、内径 4.6 mm、長さ 150～250 mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：アセトニトリル及び水(1：9)混液

保持時間の目安：8 分

2) LC/MS

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径 6～5 μ m)、内径 2～2.1 mm、長さ 150 mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：アセトニトリル及び 2 mmol/L 酢酸アンモニウム(1：9)混液

イオン化モード：ESI(+)

主なイオン(m/z)：203

注入量：2 μ L

保持時間の目安：5 分

9. 定量限界

0.01 mg/kg(茶の場合は 0.1 mg/kg)

10. 留意事項

1) 試験法の概要

ジノテフランを試料からアセトニトリルで抽出し、多孔性ケイソウ土カラム、グラファイトカーボンミニカラム及び中性アルミナミニカラムにより精製した後、HPLC-UV で測定、LC/MS で確認する方法である。

2) 注意点

(1)抽出時、豆類等の試料が十分に分散しない場合には、水で膨潤させた試料にケイソウ土を加えた後、アセトニトリルを加えてホモジナイズし、抽出効率の向上を図る。

(2)夾雑成分の多い試料では HPLC 分析において、ジノテフラン溶出後に移動相を十分に流しカラム内に残存する夾雑物を溶出させた後に、次の分析を行う。

11. 参考文献

環境省告示第 35 号「ジノテフラン試験法」(平成 14 年 4 月 24 日)

12. 類型 C