

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）
令和 5 年度 総括研究報告書

食品中残留農薬等の試験法開発における課題の解決に向けた研究

研究代表者 田口貴章（国立医薬品食品衛生研究所 食品部・第一室長）

研究要旨

食品の残留農薬等検査において、我が国の公示試験法は精製度が高いため、夾雑成分の影響を受け難く測定装置への負担も少ないが、操作時間が長い、溶媒等の使用量が多い等の難点がある。残留農薬等検査では、分析結果の信頼性の向上が求められている一方、検査の効率化、迅速化、コスト削減も望まれている。本研究では、農薬等の検出を困難にする夾雑物を含む食品や、特定の食品に含まれると検出困難な農薬等について高感度かつ高精度な測定法等を確立すると共に、分析結果の信頼性向上及び検査の迅速化を目的とし、以下の検討を行った。

課題 1 残留農薬等分析における試料調製方法の検討

食品中の残留農薬等の分布は不均一であるため、精確な分析値を得るには均質な試料を調製後、分析に供する必要がある。「農産物における試料調製方法及び試料の均質性が分析結果へ与える影響」では、農薬が残留したほうれんそうを用いて粒子の大きさが分析結果に与える影響を調査した。その結果、均質化が不十分な試料での分析値は、微細な均質化試料と比べ低くなったことから、均質化が不十分な試料では残留農薬濃度を過小評価する可能性があることが示唆された。ほうれんそうにおける十分均質な試料の目安は「目開き 1 mm の篩に負荷したときの通過率が 90%以上」と考えられた。また、「畜水産物における試料調製方法の検討」では、常温磨砕法では均質化が困難な水産物を対象に凍結粉砕法による試料調製方法を検討し、調製した試料の粉砕状況等を常温磨砕法と比較した。

課題 2 公示試験法の精製操作の簡便化・迅速化及び自動化に向けた検討

残留農薬等検査において使用頻度が高い公示試験法（通知一斉試験法等）の精製操作について、ミニカラムの充填剤量や使用溶媒量等の少量化、濃縮操作の省略等を検討し、簡便化を図るとともに、操作時間の短縮、さらに確立した方法の自動化を検討する。本年度は、通知一斉試験法「GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）」の精製操作の簡便化・自動化のため、農薬 151 化合物を対象に確立した分析法の性能を評価し、妥当性を確認した。

課題 3 前処理と分析装置のオンライン化を目指した半自動分析法の確立

我が国からの食品輸出促進のための食品の衛生管理手法の国際調和及びその推進のため、精製操作から LC-MS/MS 分析までをオンライン化し半自動化を検討した。本年度は、輸出検査で頻度の高い大豆に適用するためにグリホサート・グリホシネート類を固相抽出上で *N*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N*-methyl-trifluoroacetamid により簡便で迅速に誘導体化し、LC-MS/MS を用いて 5 成分を高感度に分析する方法を開発した。また、輸入大豆飼料への適用を検討した。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

・志田静夏（国立医薬品食品衛生研究所 食品部・第三室長）

・ 穂山浩（星薬科大学 薬学部薬品分析化学研究室・教授）

A. 研究目的

食品の残留農薬等検査において、我が国の公示試験法は精製度が高いため、夾雑成分の影響を受け難く測定装置への負担も少ないが、操作時間が長い、溶媒等の使用量が多い等の難点がある。残留農薬等検査では、分析結果の信頼性の向上が求められている一方、検査の効率化、迅速化、コスト削減も望まれている。本研究では、農薬等の検出を困難にする夾雑物を含む食品や、特定の食品に含まれると検出困難な農薬等について高感度かつ高精度な測定法等を確立すると共に、分析結果の信頼性向上及び検査の迅速化を目的とし、以下の検討を行った。

課題 1 残留農薬等分析における試料調製方法の検討

食品に残留する農薬等の分布は不均一であるため、精確な分析値を得るには均質な試料を調製後、分析に供する必要がある。しかしながら、十分に均質な試料状態を規定するために必要な科学的知見や、ミキサーを用いた試料調製法の性能評価に関する報告事例は少ない。

[1] 農産物における試料調製方法及び試料の均質性が分析結果へ与える影響の検討

昨年度、果菜類のトマトを供試作物として用いて、不十分な均質化は分析値の正確度および精度を低下させる可能性があること、試料秤取量が少ないほどその影響は大きくなる傾向があることを示した。また、試料の十分な均質化状態の判断指標として、均質化した試料を目開き 1 mm の篩に負荷した際の通過率が 90%以上となることが目安となることを示した。本年度は、トマトと形質が異なる葉菜類のほうれんそうを用いて均質化状態が異なる試料を調製し、均質化状態及び試料秤取量が分析結果に与える影響を調査した。また、篩の通過率による均質化状態の評価についても検討した。

[2] 畜水産物における試料調製方法の検討

昨年度、畜産物を対象に 3 種類の凍結粉碎法〔液体窒素・凍結方式、ドライアイス・予冷方式及びドライアイス・予備凍結方式〕の操作手順を確立した。本年度は水産物を対象に、これらの凍結粉碎法の適用性を検討した。

課題 2 公示試験法の精製操作の簡便化・迅速化及び自動化に向けた検討

食品中の残留農薬等の一斉試験法（通知一斉試験法）として「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I（農産物）」等が公示されているが、溶媒や試薬の使用量が多く、操作時間も長いため、試験法の簡便化・迅速化が望まれている。本研究では、通知一斉試験法の抽出方法は変更せず、精製方法のみを改良することにより、規格基準への適否判定に用いることができる簡便・迅速な一斉分析法を確立することを目的とした。

試薬や溶媒を少量化するとともに、一連の精製操作の自動化を図ることとした。本年度は、通知一斉試験法「GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）」の精製操作を改良し、確立した分析法の性能を評価した。

課題 3 前処理と分析装置のオンライン化を目指した半自動分析法の確立

我が国からの食品輸出促進のための食品の衛生管理手法の国際調和及びその推進のため、高毒性農薬及びネオニコチノイド農薬等を対象として、抽出は QuEChERS 法等の国際的に汎用されている方法と同じ溶媒を用い、その後の精製操作を変更すると共に精製操作から LC-MS/MS 分析までをオンライン化し半自動化を検討することで、迅速、簡便で、高感度かつ高精度な残留農薬等検査法の確立を目指す。本年度は、固相カートリッジ中での *N*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA) による簡便で迅速な誘導体化を行い、大豆中の残留グリホサート、グルホシネート、およびそれらの代謝物 *N*-アセチルグリホサート (Gly-A)、3-メチルホスフィニコ

プロピオン酸 (MPPA)、*N*-アセチルグルホシネート (Glu-A) を同時定量する液体クロマトグラフ-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) を開発のための検討を行った。また開発した方法を大豆試料中のグリホサート類の分析に適用した。

B. 研究方法

1. 全体概要

研究は、残留農薬等試験法開発の専門家で構成される班会議を開催し、各課題の目標、計画、進捗等について議論し、実施した。

班会議の参加者と開催状況は以下の通り。

【参加者】

- ・田口 貴章 (国立医薬品食品衛生研究所 食品部 第一室長)
- ・志田 静夏 (国立医薬品食品衛生研究所 食品部 第三室長)
- ・穂山 浩 (星薬科大学 薬学部薬品分析化学研究室 教授)
- ・伊藤 里恵 (星薬科大学 薬学部薬品分析化学研究室 准教授)
- ・根本 了 (国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官)
- ・菊地 博之 (国立医薬品食品衛生研究所 食品部 主任研究官)
- ・田中 里依 (厚生労働省 健康・生活衛生局 食品基準審査課 残留農薬等基準審査室 室長)
- ・中村 俊輔 (厚生労働省 健康・生活衛生局 食品基準審査課 残留農薬等基準審査室 専門官)
- ・池本 隆昭 (厚生労働省 健康・生活衛生局 食品基準審査課 残留農薬等基準審査室 審査官)
- ・堤 智昭 (国立医薬品食品衛生研究所 食品部 部長)

【開催状況】

- ・令和5年7月13日 (木) (オンライン)
- ・令和6年2月6日 (火) (オンライン)

2. 分担研究について

課題 1 残留農薬等分析における試料調製方法の検討

[1] 農産物における試料調製方法及び試料の均質性が分析結果へ与える影響の検討

1. 分析標準物質

ジノテフラン、イミダクロプリド、マラソン、ダイアジノンフルフェノクスロン、(E)-フェンピロキシメート、ペルメトリン。

2. 供試試料

作物名：ほうれんそう

分析部位：茎葉 (赤色根部を含み、ひげ根及び変質葉を除去したもの)

3. 残留分析方法

分析操作は、厚生労働省通知の「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I(農産物)」に準拠して実施した。なお、抽出方法を除き、精製の省略や定量時の機器条件の変更など一部の方法は改変した。

4. 固形物含有率の測定

アルミカップを 105°C に設定した恒温乾燥機内で 1 時間乾燥後に、デシケーター内で室温に戻して重量を測定し、分析試料を秤取した。これらを 105°C に設定した恒温乾燥機内で約 7 時間乾燥後に、デシケーター内で室温に戻して重量を測定した。乾燥後の試料重量を秤取試料重量で除して、固形物含有率を算出した。

5. 試料均質化状態の評価

5.1. 常温での均質化時間の比較

市販品ほうれんそう約 1 kg を 2~3 cm に細切した後、常温のミキサーで 0, 5, 1, 2 および 4 分間均質化した。各均質化時点で、試料の一部をシャーレに分取し、その状態を観察した。

5.2. 凍結粉碎試料の調製

市販品ほうれんそうを 2~3 cm に細切した後、冷凍庫に保管して凍結した。ミキサーで固形状ドライアイスを粉碎してパウダー状にし、凍結したほうれんそう試料に加え混合した。その半量を予冷したミキサーに入れ、数秒間均質化した。残りの試料をミキサーに入れ、さらに 4 分間均質化した。凍結粉碎後の試料を 2 L ビーカーに移し、完

全に密閉しない状態で冷凍庫に入れ、1晩かけてドライアイス昇華した。なお、ミキサーの外表面には断熱材を巻き、試料秤取用の器具およびビーカーは予冷したものを使用した。

5.3. 均質化評価用試験篩の目開きの大きさおよび通過手法の比較

5.3.1. 均質化試料の調製

市販品ほうれんそうを細切した後、常温のミキサーで均質化して、粗大な固形物が残存する『粗粉碎試料』および固形物が微細な状態である『微粉碎試料』をそれぞれ調製した。また、5.2項と同様の方法で『凍結粉碎試料』を調製した。

5.3.2. 微粉碎試料および凍結粉碎試料

微粉碎試料または凍結粉碎試料 250 g を目開き 1 mm 篩に負荷し、約 5 分間静置後に篩上の残渣重量を測定した。続いて、ヘラ処理または流水洗浄処理後に残渣重量を測定した。

5.3.3. 粗粉碎試料

粗粉碎試料 250 g を目開き 1 mm または 2 mm 篩に負荷し、前項と同様の方法でヘラ処理または流水洗浄処理を実施して通過率を算出した。なお、各実験はそれぞれ 2 名の作業員で実施した。

6. 各検討に用いる分析用試料の秤取

6.1 分析試料の秤取量および試料静置の影響

圃場施設で栽培した処理区試料の粗粉碎試料、微粉碎試料および凍結粉碎試料を均質化直後にそれぞれ 2 L ビーカーに充填した。各試料の中層から、1.00、2.00、5.00、10.0 および 20.0 g の分析試料を各 6 点秤取し、それらの農薬濃度を分析した。分析試料は、秤取ごとにビーカー内の試料をよく混和した後に操作した。なお、粗粉碎および微粉碎試料は先端口径 8 mm の駒込ピペットで秤取し、静置後の秤取時には各層を混和しないように注意しながら分析試料を採取した。凍結粉碎試料は、予冷したスパーテルを用いて秤取した。

6.2 遠心分離後の沈殿物と上澄み液の比較

よく混和した処理区の粗粉碎試料および微粉碎試料の中層から、分析試料 20.0 g を各 2 点秤取し、遠心分離 (10000×g、10 分、20°C) した。傾斜

法により沈殿と上澄み液に分画し、両画分中の重量および農薬濃度を分析した。

6.3 篩分別後の残渣と通過物の比較

処理区の粗粉碎試料約 1 kg を目開き 1 mm 篩に負荷し、ヘラ処理により篩上の残渣と通過物に分別した。両試料から、それぞれ 20.0 g の分析試料を各 6 点秤取し、農薬濃度を分析した。

各検討の詳細な内容については分担研究報告書を参照されたい。

[2] 畜水産物における試料調製方法の検討

1. 食品

あゆ、えび、うなぎ及びさけを用いた。

2. 冷却剤

液化炭酸ガス (純度 > 99.5 vol%) 及び液体窒素 (純度 > 99.99%) は購入した。ドライアイスは、液化炭酸ガスボンベ (サイホン付) にドライアイス製造装置を接続し、用時調製した。

3. 装置

粉碎機は Robot Coupe BLIXER-3D (エフ・エム・アイ製: 回転数 3000 rpm、容器容量 3.7 L) を用いた。

4. 試料調製

検体約 500 g を約 1 cm 角にカットし、常温磨砕法 (A) 及び凍結粉砕法 (B~D) の各方法で試料調製した。

A. 常温磨砕法

カットした検体約 500 g を全量、粉碎機に入れ、120 秒間磨砕した。

B. 凍結粉砕法 (液体窒素・凍結方式)

液体窒素を約 2 L にカットした検体約 500 g を加え、液体窒素が 500 mL 程度となったら、さらに約 2 L 加え、合計 4 分間冷却した。液体窒素で冷却した粉碎機に凍結試料の約半量を粉碎機に入れ、10 秒間粉砕した後、残りの凍結試料を粉碎機に加え、さらに 110 秒間粉砕した。

C. 凍結粉砕法 (ドライアイス・予冷方式)

カットした検体約 500 g 及び検体重量の 1.2 倍量のドライアイスを予冷用容器 (プラスチック製) に入れ、蓋を被せ (密閉せずに)、3 分間予冷した。

粉砕機にドライアイス 100 g (粉砕機冷却用) を入れ、約 5 秒間運転し、粉砕機を冷却した後、検体とドライアイス混合試料の約半量を粉砕機に入れ、10 秒間粉砕し、残りのドライアイス混合試料を粉砕機に加え、さらに 110 秒間粉砕した。

D. 凍結粉砕法 (ドライアイス・予備凍結方式)

カットした検体約 500 g を冷凍庫 (-30°C) で一晩静置し、凍結した。粉砕機にドライアイス 100 g (粉砕機冷却用) を入れ、約 5 秒間運転し、粉砕機を冷却した後、凍結試料の約半量を粉砕機に入れ、10 秒間粉砕し、残りの凍結試料及び検体重量の 0.6 倍量のドライアイス (約 300 g) を加え、110 秒間粉砕した。

各操作の詳細については分担研究報告書を参照されたい。

課題 2 公示試験法の精製操作の簡便化・迅速化及び自動化に向けた検討

1. 試料

キャベツ、ほうれんそう、ばれいしょ、りんご、オレンジ、玄米、大豆及び茶。玄米、大豆及び茶は、425 µm の標準網ふるいに通るように遠心粉砕機で粉砕したものをを用いた。キャベツ、ほうれんそう、ばれいしょ、りんご及びオレンジは磨砕装置を用いて細切均一化したものをを用いた。

2. 分析対象化合物

GC-MS/MS で測定可能な農薬 151 化合物。

3. 装置

自動前処理装置は残留農薬分析用自動前処理装置 ST-L400 (アイスティサイエンス製) を使用した。なお、精製ミニカラムは、オクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) ミニカラム (30 mg 及び 50 mg; それぞれ Smart-SPE C18-30 及び Smart-SPE C18-50)、エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル (PSA) ミニカラム (Smart-SPE PSA-30; 30 mg) (いずれもアイスティサイエンス製) を用いた。

GC-MS/MS はガスクロマトグラフ 7890 (Agilent Technologies 製) 及び質量分析計 Xevo TQ-XS (Waters 製) を使用した。

4. 試験溶液の調製

(1) 果実・野菜の場合

果実・野菜の場合は試料 20.0 g に、穀類・豆類の場合は試料 10.0 g に水 20 mL を加え、30 分間放置したものに、茶の場合は試料 5.00 g に水 20 mL を加え、30 分間放置したものに、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 (抽出液) とした。抽出液をバイアルに入れ、自動前処理装置にセットした。

(2) 自動前処理

以下の精製は自動前処理装置を用いて行った。

C18 (30 mg : 一段目) ミニカラムの下にノズル及び C18 (50 mg : 二段目) ミニカラムを連結し、アセトン及びアセトニトリル/水 (9 : 1) 各 1 mL で順次コンディショニングした。これに抽出液 1 mL を負荷した後、アセトニトリル/水 (9 : 1) 0.6 mL を注入した。この溶出液 (負荷液を含む) を、ノズルから注入した 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 25 mL で希釈しながら C18 (50 mg) に負荷し、溶出液は捨てた。ノズルからさらに水 1 mL を注入し、C18 (50 mg) ミニカラムを洗浄した。C18 (30 mg) ミニカラムを取り外した後、C18 (50 mg) ミニカラムを窒素気流下で 2 分間乾燥させた。

PSA (30 mg) ミニカラムをアセトン及びアセトン/ヘキサン (15 : 85) 各 1 mL でコンディショニングし、前述の C18 (50 mg) ミニカラムの下部に連結した。この連結カラムにアセトン/ヘキサン (15 : 85) 1 mL を注入し、溶出液を得た。果実・野菜の場合は、得られた溶液にアセトン/ヘキサン (15 : 85) を加えて 1 mL に定容し、試験溶液とした。穀類、豆類及び茶の場合は得られた溶液を窒素乾固し、アセトン/ヘキサン (15 : 85) 0.5 mL (茶の場合は 0.25 mL) を加えて溶解し、試験溶液とした。

各操作の詳細については分担研究報告書を参照されたい。

課題 3 前処理と分析装置のオンライン化を目指した半自動分析法の確立

1. 分析対象化合物及び食品

グリホサート (Gly)、グルホシネート (Glu)、およびそれらの代謝物 *N*-アセチルグリホサート (Gly-A)、3-メチルホスフィニコプロピオン酸 (MPPA)、*N*-アセチルグルホシネート (Glu-A)。

食用丸大豆試料は北海道産、アメリカ産、カナダ産および中国産を使用した。飼料用大豆かすはアメリカ産・ブラジル産混合、カナダ産を使用し、食用加工大豆はアメリカ産を使用した。

2. 測定装置および LC-MS/MS 最適条件

対象物質の分析には液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を使用した。液体クロマトグラフは島津製作所製の LC-30AD のポンプと SIL30AC のオートサンプラーを使用し、タンデム質量分析計は島津製作所製の LCMS-8060 を使用した。分析カラムには GL Sciences InertSustain C18 (150 mm×2.1 mm i.d., 3 μm) を使用した。MS のイオン化モードはエレクトロスプレーイオン (ESI) 化法のポジティブイオンモードで Multiple reaction monitoring (MRM) を用いて分析した。

3. 試料抽出の最適条件

凍結粉碎した大豆試料 1g を 50 mL ポリプロピレン遠沈管に秤量し、5 mL の超純水を加え、5 分間振とうした。その後 50%アセトニトリル (ACN) 水溶液を 5 mL 加えて全量 10 mL とし、振とう後、1930×g で 5 分間遠心分離を行った。上清 0.4 mL と ACN 0.6 mL を混合し、5 分静置後、1930×g で 5 分間遠心分離を行い除タンパクした。上清 0.025 mL と 10%ACN 水溶液 0.975 mL を混合し、試料抽出液とした。

4. 試料精製、標準液および固相誘導体化最適条件

固相カートリッジは Presh-AXs (第4級アミン) を用いた。10%ACN 水溶液 0.1 mL でコンディショニングした後に試料抽出液を 0.05 mL 負荷した。

0.02%酢酸水溶液 0.1 mL で洗浄後、ACN 0.1 mL で固相中の水を取り除き、脱水を行った。脱水後、10%MTBSTFA-ACN 0.1 mL によって固相中で誘導体化を行い、事前に ACN 0.4 mL を添加したバイアルへ溶出、ボルテックスを 10 秒間行った後に LC-MS/MS にて分析を行った。標準液の誘導体化については試料抽出液の処理と同様の方法を使用して負荷、10%ACN 水溶液による洗浄、脱水、誘導体化および溶出を行い、LC-MS/MS にて分析を行った。

各操作の詳細については分担研究報告書を参照されたい。

C. 研究結果及び考察

課題 1 残留農薬等分析における試料調製方法の検討

[1] 農産物における試料調製方法及び試料の均質性が分析結果へ与える影響の検討

1.1. 圃場試験の概要

高知県で施設栽培されたほうれんそうに7種の農薬製剤を2回混用散布した後、最終散布1日後に採取した茎葉を供試試料とした。供試試料の平均個体重量は約35gであり、栽培地域の農業慣行に従った適切な作物試料であった。

1.2. 分析法の妥当性評価

各分析対象農薬の妥当性確認時に作成した検量線の直線性は、相関係数 0.99 以上と良好であった。

市販品の無添加試料における各分析対象農薬の分析結果は、全て定量限界未満であった。クロマトグラム上の各分析対象農薬の保持時間に定量限界相当量の 30%を超える妨害ピークは認められず、当該分析法の選択性に問題は認められなかった。

市販品の微粉碎試料を用いた各分析対象農薬を 0.01 mg/kg、0.5 mg/kg、15 mg/kg、または 50 mg/kg 添加試料からの回収率、RSDr を求めた。さらに、無処理区の粗粉碎試料を用いた 0.5 mg/kg 添加試料での回収率、RSDr も求めたが、

全ての添加濃度においてどの分析対象農薬も規定の範囲内の結果であった。また、0.5 mg/kg 添加濃度において、試料の均質化状態が、添加回収率の算出結果に影響しないことを確認した。なお、マトリックス効果が-19~-32%認められたジノテフラン、フルフェノクスロンおよびペルメトリンについては、マトリックス検量線を採用した。

1.3. 試料均質化状態の評価

1.3.1. 均質化時間および均質化温度の比較

常温での均質化時間が長くなるに伴い固形物が微細になり、繊維質が多い茎より比較的柔らかい葉の方が微細になりやすいことを確認した。これら観察結果から、1 分間均質化した試料を目視で明らかな粗大な固形物が確認できる『粗粉碎試料』とした。また、4 分間均質化した試料を大きな固形物が見られず、弊所の通常分析と同程度の微細状態に均質化されていると判断し、これを『微粉碎試料』とした。

ドライアイス共存下でミキサー均質化した『凍結粉碎試料』は、常温状態のミキサーで4分間均質化した微粉碎試料と同様に大きな固形物が見られず、試料が微細な状態まで均質化されていることを確認した。また、各操作における試料温度及び均質化後の試料は-50℃と十分に低温に保たれており、パウダー状態であったことから、ドライアイスの添加量は適切であったと考えられる。

1.3.2. 均質化評価用試験篩の目開きおよび通過手法の比較

ヘラ処理後における平均通過率（各業者での値）は、粗粉碎試料の1 mm 篩で16%（12 または20%）、2 mm 篩で56%（52 または59%）、微粉碎試料の1 mm 篩で56%（42 または71%）、凍結粉碎試料の1 mm 篩で84%（80 または89%）であった。流水洗浄処理における通過率は、粗粉碎試料を2 mm 篩、微粉碎試料および凍結粉碎試料を1 mm 篩に負荷した場合、洗浄時間が長くなるに従い増加し、最終洗浄時間での平均通過率は、それぞれ84%（81 または87%）、94%（94 または95%）および97%（両者とも97%）となった。一方で、粗粉

砕試料の1 mm 篩負荷時では、洗浄時間4分間まで篩への試料負荷重量よりも残渣重量が大きくなったため通過率は負の値を示した。洗浄4分以降で通過率は増加していき、最終的に洗浄時間10分間での平均通過率は17%（16 または18%）となった。さらに、試験圃場で栽培されたほうれんそう試料についても各均質化試料の流水洗浄処理を用いた篩通過率を1連で確認した。粗粉碎試料、微粉碎試料および凍結粉碎試料の1 mm 篩負荷時における通過率は、最終洗浄時間でそれぞれ22%、98%および98%となり、市販品を用いた際と同程度の通過率であった。これら結果から、流水洗浄処理では使用する作物試料に関わらず、試料の均質化状態を評価可能であることが確認された。

ヘラ処理と流水洗浄処理の各篩通過手法を比較すると、ヘラ処理よりも流水洗浄処理の方が、本来、篩に残らない微細な残渣を正確に通過可能であり、異なる作業員間での再現性が高いことから、均質化試料の通過率評価方法として適切であると考えられた。さらに、流水洗浄処理での1 mm 篩における平均通過率は微粉碎試料で94%、凍結粉碎試料で97%であることから、微細に均質化された試料は参考規定⁴⁾で示される目開き1 mm 篩を90%以上通過可能であった。また、均質化の程度が異なる試料が調製できたことが確認された。

1.4. 分析試料秤取量の影響

異なる重量（1~20 g）で分析試料を秤取した際の各農薬の平均濃度を求めた。

分析試料秤取量の影響を横断的に評価するために、微粉碎試料および粗粉碎試料における20 g 秤取時の平均濃度に対する各農薬および全農薬での平均相対濃度を検討した。

微粉碎試料および凍結粉碎試料における平均相対濃度は、マラチオンを除き分析試料の秤取重量に関わらず概ね同程度であった。一方で、粗粉碎試料の平均相対濃度は、これら試料よりも低い傾向を示した。粗大な固形物が残る粗粉碎試料で相対濃度が低くなる傾向は、昨年度に実施したトマトでの分析結果とも一致する。マラチオンにお

ける平均相対濃度は、粗粉碎試料<微粉碎試料<凍結粉碎試料の順で大きくなる傾向を示し、他の農薬と異なる傾向であった。さらに、全農薬で評価した際の平均相対濃度は、微粉碎試料および凍結粉碎試料で概ね同程度であり、粗粉碎試料で低くなる傾向を示した。

次に、粗粉碎試料、微粉碎試料および凍結粉碎試料における各農薬の分析値の変動 (RSD 値) を比較した。ペルメトリン以外の農薬における RSD 値は、微粉碎試料および凍結粉碎試料では分析試料の秤取量に関わらず 5%以下と小さかった。粗粉碎試料では、分析試料を 1 または 2 g 秤取した場合に、RSD 値が 5%を超える農薬が見られた。一方で、ペルメトリンは、均質化の程度に関わらず、いずれの秤取量においても RSD 値が大きく、粗粉碎試料および凍結粉碎試料では全ての秤取重量で 5%以上となった。さらに、それぞれの農薬の特性に関わらない包括的な変動評価を実施するために、各農薬の微粉碎試料および粗粉碎試料における 20 g 秤取時の分析値で補正した相対濃度の全薬での変動を算出した。凍結粉碎法により調製した試料は、常温で均質化した試料と比較して均質性が高くなり、分析値の変動が小さくなるなどの報告がある。しかしながら、本研究では全ての秤取量において、凍結粉碎試料の RSD 値が最も大きくなり、試料均質性の向上は認められなかった。

1.5. 試料静置の影響

粗粉碎試料および微粉碎試料を 1 時間静置した後に上層、中層および下層から秤取した試料中の固形物含有率、静置後の各均質化試料の状態を比較した。固形物含有率は、下層<中層<上層の順で高くなり、下層と上層間での差は粗粉碎試料よりも微粉碎試料で大きくなった。また、静置後の均質化試料では、下層に濃い緑色の液相が薄く形成され、液相は粗粉碎試料よりも微粉碎試料で厚くなった。これらの結果より、均質化試料は静置により上部に固形物が、下部に液体が分離することが確認された。粗粉碎試料では粗大な固形物が水分を含有しているため、微粉碎試料よりも均質

化試料中の液体画分が少なく、下層に形成される液層が薄くなったと推察される。これらの試料分離傾向は、昨年度試験のトマトと同様であったが、ほうれんそうの方が試料の固相と液相の分離が緩慢であった。

粗粉碎試料および微粉碎試料を 1 時間静置した後に異なる三層から秤取した分析試料中の濃度を均質化直後の粗粉碎試料および微粉碎試料の 20 g 秤取試料中濃度で補正した相対濃度と、同時点における異なる三層間の平均分析値の変動を検討した。ジノテフラン、イミダクロプリドおよびフェンピロキシメートの相対濃度は、均質化の程度に関わらず上層、中層および下層で概ね同程度となり、三層間の分析値の変動も 3%以下と顕著に低かった。したがって、これらの農薬は静置後も均質化試料中に概ね均一に分布していることが確認された。一方で、それ以外の農薬は、下層と比較して、上層および中層で濃度が高くなった。静置後の均質化試料では、上部に固形物が、下部に液体が分布することから、これらの農薬は固形物への分布が多いため上層または中層での農薬濃度が高くなったと推察される。また、いずれの農薬でも各層における相対濃度は、粗粉碎試料よりも微粉碎試料で低くなった。この傾向は、均質化直後の分析結果と同様であった。さらに、同一層より秤取した分析試料 2 点の分析値は類似する傾向が見られた。つまり、秤取する層間での相対濃度が異なる場合でも、各層内の農薬濃度は概ね均一であることが示唆された。これらの静置後試料の分析値に関しても、昨年度試験のトマトと同様の傾向を示したが、試料分離が顕著に見られたトマトより、ほうれんそうの方が各層間での分析値の差は小さかった。

1.6. 遠心分離後の沈殿物と上澄み液の比較

よく混和した微粉碎試料の中層から秤取した分析試料を遠心分離により分画した沈殿と上澄み液中の各農薬の存在率を調査した。粗粉碎試料については、遠心分離により試料が分離せず、上澄み液が分取できなかった。粗粉碎試料は、粗大な固形物が水分を内包しているため液体画分が少

なかったと考えられる。各画分への分離が可能であった微粉碎試料における沈殿と上澄み液の重量比は 40:60 であった。ジノテフランおよびイミダクロプリドの存在率は、両画分の重量比と類似しており、上澄み液と沈殿に概ね均等に分布していることを確認した。その他の農薬は沈殿への存在率が上澄み液よりも高くなり、農薬の極性が低くなるほど沈殿への存在率が増加する傾向が確認された。各農薬の n -オクタノール/水分分配係数 ($\log P_{ow}$) と沈殿中の存在率の間には、強い正の相関が確認された。したがって、ジノテフランやイミダクロプリドのような顕著に極性の高い農薬を除き、農薬は液相より固形物へ分布しやすいことを確認した。1.5 項において、ジノテフランおよびイミダクロプリドは静置後の均質化試料中で各層間に均一に分布し、マラチオン、ダイアジノン、フルフェノクスロンおよびペルメトリンは固形物含有率が低く水分が多い下層で低くなったことは、固形物へ農薬が偏在する性質に由来することが示唆された。しかし、フェンピロキシメートについては、遠心分離による分画では固形物への存在率が高かったが、静置後試料中では各層に均一に分布しており、他の農薬と異なる傾向を示した。均質化試料中における農薬の分布が固形物への偏在性に由来する結果は、ぶどうを用いた報告⁹⁾や昨年度のトマトでの結果と一致する。

1.7. 篩分別後の残渣と通過物の比較

粗粉碎試料を目開き 1 mm の試験篩に通過させた後の篩上残渣および通過物中における各農薬の存在率と、両画分での分析値の変動を検討した。篩通過後の残渣および通過物の重量比は 80:20 となり、篩上の残渣には粗大な固形物が、通過物には水分に加えて篩を通過した微細な固形物 (<1 mm) が含まれていた。残渣への各農薬の存在率は、76~85%であり、残渣の重量比率と類似する傾向を示した。つまり、農薬の物理化学的な性状に関わらず、いずれの農薬も残渣と通過物に概ね均等に分布していた。遠心分離後の沈殿と上澄み液への分布においてジノテフラン、イミダクロプリドは同様の傾向を示した。しかし、マラチオ

ン、ダイアジノン、フルフェノクスロン、フェンピロキシメートおよびペルメトリンは固形物を多く含む沈殿画分への存在率が高くなった。しかしながら、篩による分別後の固形物が多い残渣への同様の偏在は見られなかった。ほうれんそうに茎葉散布された農薬は、表面積の大きい葉に多く付着していると推察される。さらに、常温での均質化時には繊維質の茎よりも葉の方が微細になりやすい傾向が観察されていることから、篩分別時に粗粉碎試料中の比較的細かくなった葉試料は水分と共に篩を通過したと考えられる。高濃度で農薬が残留する葉部が水分と共に篩通過物に含まれていたことが、篩分別後の各試料中濃度を均一にした要因の一つだと考えられる。一方で、遠心分離後の上澄み液には固形物がほとんど含まれていなかったことから、固形物を多く含む沈殿画分への農薬分布に各農薬の $\log P_{ow}$ が顕著に反映されたと考えられる。また、篩により分別したそれぞれの試料における各農薬の分析値の変動は、全ての農薬で通過物よりも残渣で大きくなった。残渣は水分量が少ないため、試料内で農薬が均一に広がらず、秤取した分析試料への不均一な農薬の取り込みが変動に影響を与えた要因と考えられる。

各結果の詳細については分担研究報告書を参照されたい。

[2] 畜水産物における試料調製方法の検討

令和 3 年度厚生労働科学研究「食品や環境からの農薬等の摂取量の推計と国際標準を導入するための研究」の分担課題「検査部位の変更が残留農薬等の検査及び分析結果に及ぼす影響と対処法の検討」では果実を用いて 3 種類の凍結粉碎法（液体窒素・凍結方式、ドライアイス・予冷方式及びドライアイス・予備凍結方式）の操作手順を確立し、試料の粉碎状況を常温磨砕法と比較した。昨年度は、上記の果実の試料調製方法の畜産物（牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、豚の筋肉、豚の脂肪及び鶏の筋肉）への適用性を検証し、冷却剤を増加し、粉碎に供する検体の大きさを小さく

することで畜産物にも適用できることを示した。本年度は、昨年度確立した畜産物の試料調製方法が水産物（あゆ、えび、うなぎ及びさけ）に適用できるか検討した。なお、試料の均質性は試料調製法に加え、使用する粉砕機、刃の形状、回転数、粉砕時間、検体量等によって大きく異なることから、本研究では果実や畜産物の方法を確立する際に用いた以下の条件で行うこととした。

粉砕機： 残留農薬等の検査で汎用されている Robot Coupe BLIXER-3D（回転数 3000 rpm）

運転時間： 120 秒間

検体量： 500 g

1. 試料調製方法の検討

あゆ、えび、うなぎ及びさけを 2 cm 角にカットし、各方法で試料調製した。昨年度確立した畜産物の方法と同様に、液体窒素・凍結方式では冷却剤として液体窒素を 4 L、ドライアイス・予冷方式及びドライアイス・予備凍結方式ではドライアスをそれぞれ検体量の 1.2 倍量及び 0.6 倍量用いた。その結果、あゆ及びえびではいずれの方法でも問題なく、粉砕機を運転することができた。一方、うなぎ及びさけではいずれの凍結粉砕法でも、運転中に刃の回転が停止し、粉砕することができなかった。これは、凍結した検体が刃と粉砕機の壁面/底面の間に挟まることにより、刃が回転できなくなったことが原因と考えられた。そこで、検体の大きさを 1 cm 角としてうなぎ及びさけを凍結粉砕したところ、いずれの方法でも刃の回転が停止することなく、粉砕することができた。昨年度検討した豚や鶏の筋肉についても、ドライアイス・予備凍結方式では検体の大きさを 2.5 cm 角とすると粉砕が困難であった。これらの結果から、畜水産物を粉砕する場合は、1 cm 角以下にカットしてから凍結粉砕するのがよいと考えられた。

試料調製直後の試料温度を調査したところ、液体窒素・凍結方式では $-51\sim-35^{\circ}\text{C}$ となった。本方法は、粉砕前に液体窒素で検体を凍結した後、液体窒素の非存在下で 120 秒間粉砕する方法であるが、液体窒素で凍結した検体は極めて低温となるため、粉砕中の融解は認められなかった。しかしな

がら、果実を液体窒素・凍結方式で粉砕した場合と比べて試料温度がやや高くなった。液体窒素で凍結すると、水産物の方が果実と比べて硬くなるため、粉砕時に熱が発生し、粉砕後の試料温度が高くなったものと考えられた。

ドライアイス・予冷方式ではいずれの食品も $-78\sim-75^{\circ}\text{C}$ となり、ドライアスの昇華温度とほぼ一致した。ドライアイス・予備凍結方式ではうなぎやさけは -70°C 以下となったが、検体の大きさを 2 cm 角としたあゆ及びえびではそれぞれ -36°C 及び -46°C となった。2 cm 角の検体を冷凍庫で凍結すると非常に硬くなり、1 cm 角の検体よりも粉砕時に熱が発生しやすいためと考えられた。なお、常温磨砕法で均質化した場合、試料温度は $24\sim33^{\circ}\text{C}$ となったため、熱によって分解しやすい農薬等を分析する際は凍結粉砕法で試料調製するのがよいと考えられた。

2. 各試料調製方法での粉砕状況の比較

凍結粉砕法で調製した試料はいずれの食品もパウダー状になり、均質であるように見えた。しかし、融解すると、食品によっては粉砕されていない大きい皮や骨等も認められた。このため、融解後の試料を比較することとした。

あゆ及びえびは試料調製方法間で大きな違いは認められず、1 cm×1 cm 以上の大きな粒子は確認できなかった。一方、うなぎ及びさけでは、いずれの方法でも粉砕されていない 1 cm×1 cm 以上の皮や骨が認められ、常温磨砕法の方が凍結粉砕法よりも大きな皮が見られた。

いずれの試料も粘性が高く、1 cm×1 cm 以上の皮や骨以外を比較するのは困難であった。そこで、得られた試料を用いて抽出操作を行った後、目開き 1 mm のふるいを通し、ふるい上の残渣を比較することとした。抽出は試料 10.0 g にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズ（1 分間）または振とう（5 分間）することにより行った。なお、抽出操作はいずれも 1 回とした。その結果、あゆ及びえびでは振とう抽出よりもホモジナイズ抽出の方が抽出後の残渣の粒子が小さくなる傾向が見られた。また、えびでは常温磨砕法より凍結粉砕法

の方が残渣の粒子が小さくなる傾向が見られた。一方、あゆでは抽出法（ホモジナイズ/振とう）や試料調製法（常温磨砕法/凍結粉砕法）による大きな差は認められなかった。うなぎ及びさけを凍結粉砕した試料では、振とう抽出後も1 cm×1 cm以上の大きい皮が見られた。また、凍結粉砕した試料をホモジナイズ抽出したところ、ポリトロン刃に皮等が絡まって回転が途中で停止し、操作が困難であった。常温磨砕した試料では、抽出時に刃の回転が停止することなく、ホモジナイズを行うことができたが、大きな皮は細かくならなかった。常温磨砕した試料で、ホモジナイズ抽出の際に回転が停止しなかったのは、凍結粉砕した試料よりも皮が大きいため、ポリトロン刃に絡まりにくかったためと考えられた。これらの結果から、うなぎ及びさけは凍結粉砕法、常温磨砕法のいずれも、均質化が不十分と考えられた。試料粒子の大きさは抽出効率や分析値のばらつきに大きく影響する可能性がある。このため、常温磨砕法、凍結粉砕法のいずれも粉砕時間を長くする等により、均質性をさらに向上させる必要があると考えられた。また、試料粒子の大きさによる抽出効率や分析値のばらつきへの影響を検討する必要があると考えられた。

各結果の詳細については分担研究報告書を参照されたい。

課題2 公示試験法の精製操作の簡便化・迅速化及び自動化に向けた検討

1. 測定条件

本検討では GC-MS/MS で測定可能な農薬を対象とした。測定は高感度な測定が可能な APCI 法を用いて行った。EI 法では通常、キャリアガスとしてヘリウムを用いるが、APCI 法ではヘリウムの代わりに窒素を用いても大きな感度低下は見られないため、窒素を用いた。最終試験溶液は、試料中濃度が 0.01 ppm のとき、0.002 µg/mL となるように試験溶液の調製方法を検討した。

2. 試験溶液調製方法の検討

(1) 抽出

本検討では簡便且つ規格基準への適否判定に用いることができる一斉分析法を開発することを目的とした。このため、抽出は通知一斉試験法「GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）」に従って行い、果実・野菜（試料 20.0 g）ではアセトニトリル（1 回目 50 mL、2 回目 20 mL）で 2 回ホモジナイズ、穀類・豆類（試料 10.0 g）では水（20 mL）を加えて膨潤した後、アセトニトリル（1 回目 50 mL、2 回目 20 mL）で 2 回ホモジナイズ、茶（試料 5.00 g）では水（20 mL）を加えて膨潤した後、アセトニトリル（1 回目 50 mL、2 回目 20 mL）で 2 回ホモジナイズを行い、抽出することとした。

(2) 精製

GC-MS/MS を用いて食品中の残留農薬を測定する際、マトリックスの影響を受けずに定量するためには測定前に脂質等の低極性夾雑成分や、高極性夾雑成分、酸性夾雑成分、色素等を除去する必要がある。通知一斉試験法は塩析により高極性夾雑成分を除去した後、ODS ミニカラムで低極性夾雑成分を除去し（穀類、豆類、茶の場合）、PSA 及びグラファイトカーボンで酸性夾雑成分及び色素を除く方法であり、海外で広く用いられている QuEChERS 法よりも精製効果が高いと考えられる。しかしながら、通知一斉試験法は精製に供する抽出液量が多いため、充填剤量が 500~1000 mg のミニカラムを用いており、使用する溶媒量も多い。また、塩析や、沸点が比較的高い水やトルエンを濃縮・乾固する操作があるため、時間を要する。そこで、溶媒や試薬の使用量を削減するとともに、操作時間の短縮を図ることとした。また、一連の精製操作を自動前処理装置を用いて行うことができるよう検討した。

①低極性夾雑成分の除去方法の検討

低極性夾雑成分を除去するため、C18 ミニカラム精製を検討した。操作時間を短縮するため、濃縮は行わず、抽出液をそのままミニカラムに負荷することとした。また、精製に用いるミニカラムの充填剤量を削減するため、精製に供する抽出液量を 1 mL（通知一斉試験法の 1/20）とし、C18 ミ

ニカラムは充填剤量 30 mg（通知一斉試験法の約 1/33）のものを用いることとした。通知一斉試験法では塩析後のアセトニトリル層を C18 ミニカラムに負荷し、アセトニトリルで溶出する。しかし、本条件では農薬とともに多くの低極性夾雑成分も溶出してしまいう可能性が高い。そこで、C18 ミニカラム精製における溶出溶媒/溶媒量の農薬回収率及び精製効果への影響について検討した。溶出溶媒としてアセトニトリル/水（8：2）、（9：1）、（19：1）及びアセトニトリルを用いて溶出溶媒量 0.1～1 mL で農薬の回収率を確認した。アセトニトリル/水（8：2）0.6 mL では低回収率（約 70%）であったが、アセトニトリル/水（9：1）、（19：1）及びアセトニトリルでは 0.5 mL 以上で良好な回収率（ $\geq 95\%$ ）が得られた。C18 ミニカラムからの溶出溶媒としてアセトニトリル/水（9：1）、アセトニトリル/水（19：1）及びアセトニトリル（いずれも 0.6 mL）を用いて、（C18 ミニカラム（一段目）からの溶出溶媒/溶媒量を除く）大豆のブランク試験溶液を調製し、GC-（EI）MS でスキャン測定して TIC クロマトグラムを比較した。その結果、アセトニトリル/水（9：1）及び（19：1）の方がアセトニトリルよりも精製効果が高いことが示された。アセトニトリル/水（9：1）及び（19：1）では TIC クロマトグラムに大きな違いは認められなかった。溶出に用いるアセトニトリル量が多いと、後述する二段目の C18 ミニカラム精製での洗浄の際に農薬が保持されず、溶出されやすくなってしまいうことから、アセトニトリル/水（9：1）0.6 mL で溶出することとした。なお、本条件で低回収率（ $< 80\%$ 、マトリックス存在下）となったのは fenpropimorph（75%）のみであった。

②高極性夾雑成分の除去方法の検討

通知一斉試験法では塩析により、高極性夾雑成分を除去する方法を採用しているが、操作がやや煩雑である。そこで、①で得られた溶出液を水または塩化ナトリウム溶液で希釈しながら、C18 ミニカラム（二段目）に負荷することで、農薬は保持させ、高極性夾雑成分のみ溶出して除去し、その後、保持した農薬を低極性溶媒で溶出する方法

を検討した。なお、C18 ミニカラム（二段目）への負荷・洗浄の際、充填剤量が多いカラムを用いた方が農薬をカラムに保持させやすいと考えられたため、C18 ミニカラムは充填剤量 50 mg のものを用いた。溶出液を希釈する際は、水よりも塩化ナトリウム溶液を用いた方が、塩析効果により農薬が C18 ミニカラム（二段目）に保持されやすくなるものと推測された。そこで、希釈溶媒として水、5 w/v%塩化ナトリウム溶液及び 10 w/v%塩化ナトリウム溶液を検討した。C18 ミニカラム（二段目）からの溶出にはアセトン/ヘキサン（15：85）1 mL を用いた。

ほうれんそう抽出液に農薬を添加し、C18 ミニカラム（一段目）に負荷した。溶出液に 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 25 mL を加えて希釈しながら、C18 ミニカラム（二段目）に負荷し、水で洗浄後、アセトン/ヘキサン（15：85）1 mL で溶出した。その結果、cyanazine、dimethoate、lenacil、fenpropimorph、oxadixyl、phosphamidon 及び propoxur で回収率 70%未満となったが、その他の農薬では良好な回収率が得られた。低回収率の農薬のうち、fenpropimorph は①で述べたように C18 ミニカラム（一段目）から十分溶出されないことが主な原因と考えられた。一方、cyanazine、dimethoate、lenacil、oxadixyl、phosphamidon 及び propoxur は比較的極性の高い農薬（ $\log P_{ow} \leq 2.1$ ）であるため、C18 ミニカラム（二段目）での負荷・洗浄の際に一部溶出してしまうことが原因と考えられた。これらの農薬は希釈溶媒として水を用いると回収率が 1～26%低下したことから（図 5-1）、希釈溶媒として 10 w/v%塩化ナトリウム溶液を用いると塩析効果によって若干回収率が向上することが確認された。また、ピレスロイド系農薬（fluvalinate、permethrin 等）や有機塩素系農薬（DDT、DDE 等）は、希釈する溶媒を 10 w/v%塩化ナトリウム溶液から水に変更すると回収率が低下した。これらの農薬は低極性であるため、水のみで希釈するとミニカラムの内壁または充填剤に吸着し、アセトン/ヘキサン（15：85）を加えても溶出されにくくなることが示唆された。

以上の結果から、C18 ミニカラム（一段目）からの溶出液を 10 w/v% 塩化ナトリウム溶液で希釈しながら、C18 ミニカラム（二段目）に負荷し、水で洗浄後、低極性溶媒で農薬を溶出することとした。なお、本条件で低回収率となる農薬（fenpropimorph を除く）は、昨年度確立した LC-MS/MS を用いた一斉分析法で分析が可能であった。

③ 酸性夾雑成分及び色素の除去方法の検討

酸性夾雑成分を除去するため、②で得られた C18 ミニカラム（50 mg；二段目）の下に PSA ミニカラム（30 mg）を接続し、農薬を C18 ミニカラムから溶出するとともに、PSA ミニカラムで精製する方法を検討した。まず、C18 ミニカラム（50 mg）の下に PSA ミニカラム（30 mg）を接続し、アセトン/ヘキサン（15：85）で負荷・溶出したところ（負荷及び溶出溶媒量 1 mL）、比較的極性が高い dimethoate（42%）及び oxadixyl（63%）を除き、良好な回収率が得られた。次に、ほうれんそう抽出液に農薬を添加し、（PSA の溶出溶媒/溶媒量を除く）試験溶液を調製し、PSA の溶出溶媒及び溶媒量による回収率への影響を検討した。溶出溶媒/溶媒量はアセトン/ヘキサン（15：85）、（20：80）、（25：75）及び（30：70）0.6～1 mL を検討した。アセトン/ヘキサン（15：85）及び（20：80）では 1 mL で溶出することにより 90%以上の回収率が得られた。また、アセトン/ヘキサン（25：75）では 0.8 mL 以上、アセトン/ヘキサン（30：70）では 0.7 mL 以上で溶出することにより、90%以上の回収率が得られた。

C18 ミニカラム（30 mg；一段目）からの回収率が低い農薬や C18 ミニカラム（50 mg；二段目）への負荷及び洗浄の際に溶出してしまう高極性農薬を除き、アセトン/ヘキサン（15：85）1 mL を溶出溶媒として用いた場合に PSA ミニカラムから十分溶出せず、低回収率となるのは fludioxonil のみであった。fludioxonil はアセトン/ヘキサン（20：80）では 1 mL、アセトン/ヘキサン（25：75）では 0.9 mL 以上、アセトン/ヘキサン（30：70）では 0.7 mL 以上で溶出した場合、80%以上の

回収率が得られた。

各溶出溶媒を用いて得られたほうれんそうのブランク試験溶液を目視で比較したところ、溶出溶媒のアセトン濃度を高くするほど、試験溶液の色が濃くなり、色素が溶出することが示された。

これらの結果から、fludioxonil を除き高い回収率が得られ、精製効果も高いアセトン/ヘキサン（15：85）1 mL で溶出することとした。なお、本溶出条件では、茶においても試験溶液は薄い黄色であったことから、グラファイトカーボンによる追加精製は不要と考えられた。

グラファイトカーボンを精製に用いる場合、平面構造を有する農薬を溶出させるため、トルエンを溶出溶媒として用いる必要があり、濃縮操作に時間がかかるが、本方法はグラファイトカーボン精製を行わない方法であるため、操作時間を短縮することができた。

2. 妥当性評価試験

玄米、大豆、キャベツ、ほうれんそう、ばれいしょ、りんご、オレンジ及び茶について添加濃度 0.01 ppm で 1 日 2 併行、5 日間の妥当性評価試験を行った。キャベツ中の etofenprox（残留濃度 0.01 ppm、基準値 0.9 ppm）、tolclofos methyl（残留濃度 0.006 ppm、基準値 2 ppm）、りんご中の acrinathrin（残留濃度 0.004 ppm、基準値 0.7 ppm）、cypermethrin（残留濃度 0.006 ppm、基準値 2 ppm）及び tebufenpyrad（残留濃度 0.006 ppm、基準値 1 ppm）、オレンジ中の fludioxonil（残留濃度 0.2 ppm、基準値 10 ppm）、pyrimethanil（残留濃度 0.4 ppm、基準値 10 ppm）、茶中の etoxazole（残留濃度 0.004 ppm、基準値 15 ppm）の残留が認められたため、評価対象外とした。なお、いずれも基準値未満であった。大豆中の triadimenol 及び茶中の isoprocarb で妨害ピークが認められた以外はいずれの食品/農薬の組み合わせにおいても妥当性評価ガイドラインの選択性の目標値を満たした。真度、併行精度、室内精度及び選択性の目標値を満たしたのは、玄米 151 中 142 化合物（94%）、大豆 151 中 132 化合物（87%）、キャベツ 149 中 140 化合物（94%）、ほうれんそう 151 中 143 化合物（95%）、

ばれいしょ 151 中 141 化合物 (93%)、りんご 148 中 140 化合物 (95%)、オレンジ 149 中 142 化合物 (95%)、茶 150 中 139 化合物 (93%) であった。いずれの食品/農薬の組み合わせも真度は 120% 以下であった。

茶において一部の農薬でマトリックスの影響が大きかったものの、その他の食品/農薬では大きな影響はなく、本方法は精製効果が高いことが示された。茶の deltamethrin を除き、溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比は 0.8 以上であった。したがって、茶の deltamethrin (真度 62%) を除き、真度が <70% となり、妥当性評価ガイドラインの目標値を満たさなかった化合物はいずれもマトリックスの影響が原因ではないと考えられた。

全ての食品で真度が低かった農薬のうち、fludioxonil は PSA ミニカラムから十分溶出されないことが原因と考えられた。一方、fludioxonil 以外の農薬は極性が比較的高いことから ($\log P_{ow}$ が 2.1 以下)、二段目の C18 への負荷及び洗浄の際に溶出することが原因と考えられた。なお、 $\log P_{ow}$ が 2.1 未満であっても dimethenamid ($\log P_{ow}$ 1.9)、fosthiazate ($\log P_{ow}$ 1.7)、metalaxyl ($\log P_{ow}$ 1.8) は良好な回収率が得られたことから、 $\log P_{ow}$ 1~2 程度の農薬が二段目の C18 に保持されるか否かは $\log P_{ow}$ の情報のみでは判別できないと考えられた。

大豆では、これらの農薬に加えて $\log P_{ow}$ が 5.4 以上の低極性の農薬の回収率が低かった。これらの農薬を大豆抽出液に添加して回収率を求めたところ、いずれの農薬も良好な回収率が得られたことから、アセトニトリル (1 回目 50 mL、2 回目 20 mL) を抽出溶媒として用いると大豆のような脂質の多い試料から十分に回収できないものと考えられた。これらの低極性農薬を抽出する場合は、アセトニトリル量を多くするか、アセトンなどの溶媒を用いる必要があると考えられた。

各結果の詳細については分担研究報告書を参照されたい。

課題 3 前処理と分析装置のオンライン化を目指した半自動分析法の確立

1. 固相誘導体化による LC-MS/MS 条件の最適化

1-1. 固相誘導体化反応と MS 条件の検討

条件検討混合標準液を用いて、MTBSTFA 試薬によって固相誘導体化を行い、Gly 類 5 $\mu\text{g/L}$ および Glu 類 0.5 $\mu\text{g/L}$ に調製し、MRM 条件の最適化を行った。本研究で用いたシリル化反応はケイ素原子に OH 基上の酸素が攻撃し、5 配位の中間体を経て、酸素に *tert*-Butyldimethylsilane (TBDMS) が置換する反応である (Scheme 1)。本研究では、陰イオン交換固相カートリッジに測定対象物質を保持させた後に、脱水を行い、誘導体化試薬溶液を通すことで固相誘導体化を行うこととした。誘導体化させた各標準液をフローインジェクションにより、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法で MS に導入し、スキャンモードとプロダクトイオンスキャンモードで分析を行うことによって、誘導体化した標準液のイオン化条件の最適化を行った。ESI 法のポジティブ、ネガティブイオンモードで比較を行った結果、すべての標準液においてポジティブイオンモードで高い感度を得た。その後、誘導体化標準液のプリカーサイオン、プロダクトイオン、電圧等の最適化を行った。

1-2. 移動相の検討

シリル化反応後の化合物は加水分解を起こすことが報告されている。このため、移動相に酸や水を入れることなく有機溶媒のみで検討を行う必要があると考えた。条件検討用混合標準液を用いて、移動相として主に使用される MeOH および ACN を選択した時のそれぞれのピーク面積値から感度および精度を算出し、比較検討を行った。その結果、ACN は MeOH に比べて Gly、Gly-A、及び MPPA において有意に感度が高かったが、どちらも精度が良好でなかった。この結果を踏まえて、イオン化を安定させるために酢酸アンモニウムを移動相に添加することを考えた。酢酸アンモニウムは ACN に溶けないため MeOH に溶かし、酢酸アンモニウム MeOH の移動相で感度、精度、

添加濃度について同様の誘導体化標準液を用いて再検討した。その結果、酢酸アンモニウムを添加することで Glu 類の感度が ACN に比べて有意に向上し、さらに精度も向上した。また、添加濃度は 0.2 mM の時に高感度を示した。感度が高く、精度が安定した 0.2 mM 酢酸アンモニウム-MeOH を移動相の最適条件とした。

1-3. 流速の検討

最適とした移動相の MeOH は構造中の OH 基により徐々に誘導体化標準液を分解させると考え、分解を起こさずに感度、精度共に最適な流速を検討することとした。その結果、感度および精度が安定した流速 0.2 mL/を最適条件とした。

1-4. LC カラムの検討

誘導体化後の標準品は高極性から低極性へと変化する。最適化した移動相は塩を除いて水を含まない 100%の MeOH であることから、保持力の高いカラムが必要であると考えた。そのため、炭素数が 23%である GL Sciences 社製の Inertsil ODS-HL (150 mm×2.1 mm i.d., 3 μm) と InertSustain C18 (150 mm×2.1 mm i.d., 3 μm) 用いて感度、精度および保持時間の比較検討を行った。その結果、HL カラムは Gly-A が有意に高い感度を示し、C18 カラムは Glu 類が有意に高い感度を示した。精度については両カラムともに良好な結果を示したが、C18 カラムは保持時間が短く移動相による分解も抑えられることやピークの形状も良好であったことから C18 カラムを最適 LC カラムとした。

1-5. カラムオープンおよびオートサンプラー温度の検討

シリル化反応は温度条件によって反応性や精度が変動する。90℃等の高温条件で反応させると、OH 基の他に Gly や Glu に存在する第 1 級アミンや第 2 級アミンがシリル化することが知られている。本研究では、室温条件の固相中で反応させるため、アミンへのシリル化は起こらないと考え、感度や精度に関してカラムオープンやオートサンプラーの温度検討を行った。カラムオープンの温度を 40℃に設定し、オートサンプラーの温度を 4℃と 20℃に設定した条件で比較検討を行った。

その結果、4℃設定において Gly-A および MPPA において有意に高い感度を示したがどちらも精度が低い結果であった。これはカラムオープンの温度が高いことで、移動相の MeOH と誘導体化後の加水分解反応が促進し精度が低下したと推測した。そこで、カラムオープンの温度を 30℃に設定し、オートサンプラーの温度を 4℃および 20℃に設定した条件で再検討を行った。その結果、オートサンプラー温度 4℃の方が Gly、Gly-A、Glu および MPPA において有意に高い感度を示し、20℃設定の方は Glu-A において有意に高い感度を示した。また、精度においてはどちらも良好な結果を示した。このことから、感度と精度が良好なカラムオープン 30℃、オートサンプラー4℃を最適条件とした。

2 高極性農薬と誘導体化試薬の反応条件の最適化

2-1. 誘導体化試薬の検討

シリル化反応はケイ素の置換基によって反応性や精度が変化する。ケイ素にメチル基が 3 つ結合した Trimethylsilyl (TMS) 化が最も反応しやすく、分解もしやすい。先行研究において TMS 化標品と TBDMS 化標品の MS スペクトルを比較したところ、TBDMS 化標準液の MS スペクトルの感度が高い結果を示している。仮に本研究で TMS 化試薬を用いた場合に、すでに最適化した移動相の MeOH によって分解すると推測した。このため、加水分解への安定性も考慮に入れて固相中での反応速度も高い TBDMS 化試薬を用いた。先行研究において、TBDMCS と塩基による反応によって誘導体化反応が触媒され、反応性を高めるため、GC-MS 分析においては MTBSTFA に 1%TBDMCS が加わった試薬を用いる分析法が多く報告されている。そこで、MTBSTFA 試薬と 1%TBDMCS+MTBSTFA 試薬による反応速度や感度について検討を行った。その結果、どちらの試薬を使っても迅速に誘導体化は可能であったが、1%TBDMCS が添加されている群において Gly および Glu が分解し、感度が不十分となった。これは、誘導体化後に生成する塩化物イオンがケイ素

と親和性が高いため、塩基として誘導体化後標品と反応し分解を促していると考えた。このため、MTBSTFA 試薬を最適誘導体化試薬とした。

2-2. 誘導体化試薬の固相カートリッジ中での反応時間と希釈溶媒の検討

MTBSTFA による固相誘導体化方法は報告されていないことから、固相中での反応時間、希釈溶媒や溶出後の時間経過による安定性を検討した。はじめに、固相カートリッジ中で誘導体化試薬液負荷後の即座に溶出する検体と 5 分放置した後に溶出する検体を比較した。その結果、固相カートリッジ中に保持している標準品と誘導体化試薬は即時に反応することが判明した。溶液負荷後の固相中で放置すると誘導体化試薬および溶媒が揮発する可能性があったため、誘導体化試薬液負荷後、即座に溶出することを最適な条件とした。次に誘導体化後に希釈する溶媒を MeOH および ACN として安定性の比較検討を行った。希釈溶媒として比較した MeOH は誘導体化してから測定する毎に低下し、誘導体化後 90 分で 0 分に比べて Gly および Gly-A において、大きな感度低下が確認された。対して、ACN は誘導体化してから 90 分経過しても安定であり、また 24 時間経過しても大きく感度は低下しなかった。この結果から、連続分析を行う場合には、希釈液は ACN を最適条件とした。

2-3. 誘導体化試薬濃度の検討

誘導体化試薬濃度が感度や精度に影響すると考え、溶出段階の誘導体化試薬濃度を 1、10、50%MTBSTFA-ACN 溶液に調製して、感度と精度の検討を行った。検討の結果、すべての誘導体化試薬濃度間で有意差はなく、精度についても大きな差は見られなかった。1%MTBSTFA 溶液は Gly や Glu が他の群に比べてバラツキが大きいことや 50%MTBSTFA 溶液時の Glu 類は他の群に比べて高いが Gly 類の感度が低いため、他の群に比べて感度と精度が概ね良好な 10%溶液を最適とした。

2-4. 固相誘導体化による迅速化と高感度化

従来の誘導体化法での問題点は反応時間や反応温度、溶媒除去等である。測定対象物質の従来

法として、Fmoc-Cl、オルト酢酸トリメチル、3,6-dimethoxy-9-phenyl-9H-carbazole-1-sulfonyl chloride (DPCS-Cl) 等数多くの誘導体化試薬による分析法が開発されている。しかし、反応温度が高い条件が多く反応時間も長いことが課題とされている。また、オルト酢酸トリメチルによる誘導体化では減圧乾固で溶媒を除くことから溶媒除去に時間を要している。そこで、本研究の固相誘導体化によって反応温度や反応時間の比較評価を行った。その結果、本研究での固相誘導体化法によって反応時間は数秒、反応温度は室温 (25°C) で行えたことから、本分析法は従来法よりも簡便で迅速であることが明らかとなった。さらに、昨年度確立したはちみつの非誘導体化法と固相誘導体化法による感度の差を 5 µg/L 混合誘導体化標準液により評価を行ったところ、非誘導体化法と比べて Gly : 3208 倍、Gly-A : 308 倍、Glu : 3 倍、Glu-A : 75 倍、MPPA : 23 倍もの感度向上が見られたため、MTBSTFA の誘導体化によって高感度化を可能にした。

3. 大豆の前処理の最適化

3-1. 抽出条件の検討

大豆の栄養成分はタンパク質、炭水化物、脂質で約 8.5 割を占める。その中でもタンパク質は約 40%を占め、その多くが水溶性を示すことから、目的対象物質に混在し、マトリックスとしてイオン化障害を起こすことが考えられる。そこで、ACN による除タンパクを試みた。はじめに、凍結粉砕大豆 1 g に混合標品溶液の濃度が Gly、Gly-A:5 µg/g、Glu、Glu-A、MPPA:0.5 µg/g となるように添加し、室温で 30 分浸透させた。その後、超純水 10mL を加え、振とう、遠心分離 (1920×g) を各 5 分ごとに行い水抽出した。水抽出液 0.5 mL と ACN0.5 mL にて除タンパクを行った。除タンパク後の溶液を希釈し、AXs 固相カートリッジに通し、誘導体化を行うことで回収率 ((標品添加検体-検体ブランク/標準液) × 100 (%)) および併行精度 (回収率標準偏差/回収率平均 × 100 (%)) を算出した。その結果、グリホサートおよびグルホシネートの回収率が 120%を超え、グルホシネートに

については精度も若干低かった。このことから、除タンパク効率が悪いと考え、除タンパク時の ACN を 0.8 mL、超純水を 0.2 mL に変更し、同様の誘導体化方法によって回収率と併行精度を算出した。その結果、Gly の回収率が 40%まで低下してしまい、除タンパク時の ACN 量が過剰であると考えた。そこで、水抽出を 2 段階に分け、1 段階目は超純水 5 mL、2 段階目は 50%ACN 水溶液 5 mL 加えて水抽出と軽度の除タンパクを行った。その後、抽出液 0.4 mL と ACN 0.6 mL による除タンパク質を行い、同様の誘導体化法によって回収率と精度を算出した。その結果、すべての対象物質において 70-120%に収まる良好な平均回収率を示したが、個々で見ると回収率が 120%を超えている検体や併行精度も 10%に近い結果を示した。このことからタンパク質以外にイオン化に影響を与えるマトリックスが残留し、回収率や精度を低下すると考え、精製によって良好な回収率と精度の算出を目指した。

3-2. 陰イオン交換型固相カートリッジの検討

目的対象物質は中性の水溶液中において、リン酸基やカルボキシ基がイオン型となり負電荷を持つ。このことから、陰イオン交換型固相カートリッジに保持させることが可能と考えたが、使用する官能基によって保持の強さやマトリックスの精製力等が異なるため固相カートリッジの検討が必要であると推測した。また、陰イオン交換官能基に加えて疎水性官能基や陽イオン交換官能基を混合で持つ固相カートリッジは目的対象物質の性質上、保持力の悪化の可能性があると考え、陰イオン交換官能基のみで構成される固相カートリッジについて誘導体化標品を用いて感度および精度の比較検討を行った。比較検討を行った固相カートリッジはシリカゲル担体にアミノプロピル基 (-CH₂CH₂CH₂NH₂) を結合させた NH₂ 固相カートリッジとポリマー担体に 4 級アミン (-N(CH₃)₃⁺) を結合させた AXs 固相カートリッジの 2 種類である。検討の結果、すべての対象物質において AXs を使用した方が NH₂ 使用時に比べて有意に高値を示し、精度も高くなった。この現

象は、負荷の際に目的対象物質が NH₂ へ保持せずに溶出したと思われた。AXs 固相カートリッジ中の官能基の窒素は NH₂ 固相カートリッジ中の官能基の窒素よりもカチオン性が高いため測定対象物質が強く保持し、誘導体化できたと考えた。このため、シリカゲル担体の固相カートリッジを使用することは避け、感度と精度が共に良好であったポリマー担体の AXs 固相カートリッジを使用することとした。

3-3. 疎水性保持型固相カートリッジによる精製の検討

大豆抽出後のマトリックスには、脂質（レシチン）や不溶性食物繊維等が含まれていることから、はじめに疎水性物質除去による回収率および精度の向上を試みた。そこで、疎水性物質等を保持する C18 固相カートリッジや親水性および疎水性物質をバランスよく保持する PBX（担体：ポリスチレンジビニルベンゼン）固相カートリッジ（上側）と AXs 固相カートリッジ（下側）を連結し、上側の C18 および PBX には疎水性の夾雑物質を AXs には目的対象物質を保持させることによる回収率と併行精度を算出した。保持したマトリックスを誘導体化並びに溶出させないために、固相誘導体化や溶出を行う際には、連結している C18 および PBX を外し、固相の充填がない空の固相カートリッジを連結させ誘導体化を行った。その結果、C18-AXs（連結）および PBX-AXs で精製を行うことで回収率が低下した。原因として、C18 および PBX への対象物質の保持が考えられる。C18 はシリカゲルに炭素を 18 個結合させた構造を取り、すべてのシリカゲルに反応することはなく、シラノールとして残留している場合が多い。このため、高極性を示す対象物質がシラノールとの水素結合やイオン結合によって保持すると考えた。また、PBX については親水性物質と親和性を示すことから対象物質を保持すると考えた。シラノール活性は酸性側で抑制できることから、負荷前のコンディショニングにおいて酢酸水溶液の添加を行ったが、回収率は依然低い状態であっ

たため疎水性保持型固相カートリッジ以外の精製を考えた。

3-4. 酢酸洗浄による夾雑成分の排除

抽出後の溶液には水溶性ビタミンであるナイアシン（ニコチン酸）、パントテン酸や他の酸性物質を含んでいると考えた。これら物質は構造中にOH基を有し、中性条件下の水溶中では負電荷を持つことからAXs固相カートリッジにイオン結合することが考えられる。これらのマトリックスがイオン化促進や精度の低下を起こしていると考え、選択的に除去を考えた。そこで、固相カートリッジ洗浄工程で酢酸による酸洗浄を行うこととした。酢酸濃度を0.02%、0.1%に設定し、感度と精度を検討した結果、0.1%の時にGly類が有意に高くなり、Glu、Glu-Aは0.02%の時に有意に高くなった。Glu類の感度はGly類に比べて低いことから、感度低下を抑える目的で、0.02%酢酸水溶液を最適条件とした。最適化した抽出、精製条件で回収率を算出したところ、回収率、併行精度共に良好な結果を示した。最適化した条件で妥当性評価試験を行うこととした。

4. 妥当性評価試験の実施

4-1. 絶対検量線法による直線性の確認

これまでLC条件、MS条件および誘導体化試薬について最適化を行った。最適化した方法で誘導体化標準液の段階希釈による絶対検量線を算出し、直線性の評価を行った。Gly、Glu-Aは0.1-2 µg/Lの範囲でGlu、Glu-A、MPPAは0.02-0.4 µg/Lの範囲で検量線を作成し、決定係数を確認した。この結果、 $R^2=0.994$ 以上の直線性を示したことから、直線性は良好と判断した。

4-2. マトリックス効果の検証

北海道産の無農薬大豆を用いて、マトリックス効果を算出した。マトリックス効果は一般的にブランク前処理後溶液に標準液を添加し、目的対象物質の標準液で割った値に100を乗じた値で算出し、その値が80-120%内に収まることで無視できるとされている。しかし、本研究では標準液を固相カートリッジを通して誘導体化しているため、大豆ブランク溶出後に直接添加することができ

ない。標準品を誘導体化させ大豆ブランク中に添加することはできるが、バイアル中での誘導体化試薬濃度が大豆ブランク添加群と誘導体化標準液で差が起こることから正確に比較することが困難であると考えた。そこで、大豆ブランク抽出液および混合標準液はどちらも固相カートリッジを通して誘導体化しているため、固相カートリッジ中での影響は無視できると考えた。このため、抽出後の溶液に混合標準液を添加し、誘導体化を行ったピーク面積値を各誘導体化標準液のピーク面積値で割った値に100を乗じてマトリックス効果を算出した。その結果、93.1-104.7%に収まる良好な数値を示し、先行研究のマトリックス効果と比較しても良好な数値であったことから、しっかりと妨害物質を除外できると考えた。

4-3. 添加回収試験の実施

最適化した方法を用いて、選択性、回収率、精度および定量限界について検討した。評価方法については、厚生労働省のガイドラインに基づき試験者2人、1日2併行、3日間で実施した。最適化した方法で目的対象物質を含まない大豆ブランクを測定したところ、妨害するピークは確認できず選択性は十分であると判断した。日本における大豆中のGlyの規制値はGlu-Aと合算して20 mg/Lであり、Gluの規制値はGlu-AおよびMPPAと合算して2 mg/Lである。ガイドラインにおいては基準値もしくは基準値の半分を添加すると記載されていたため、Gly類は各5 mg/L、Glu類は各0.5 mg/Lとなるように大豆へ添加し、同濃度となるように調製した誘導体化標準液とのピーク面積値で回収率を算出した。得られたピークデータから回収率を算出し、その回収率を一元配置分散分析法で統計処理し、併行精度および室内再現精度を算出した。その結果、回収率、併行精度および室内再現精度共に妥当性評価ガイドラインの基準値（回収率70-120%、併行精度10%未満、室内再現精度15%未満）を満たした。また、定量下限値はS/N比=10より、Gly類0.05 mg/L、Glu類0.1 mg/Lと算出した。以上の結果から、本研究で開発した分析法の妥当性が確認された。

4-5. 大豆への適用

開発した分析法を用いて、食用丸大豆、食用加工大豆、飼料用大豆への適用を行い、信頼性と実用性について評価を行うこととした。対象として、食用丸大豆（北海道産、アメリカ産、カナダ産、中国産）4 サンプル、食用加工大豆（アメリカ産）1 サンプル、飼料用丸大豆（アメリカ産 GM、Non-GM 各 3 サンプル、アメリカ産 5 サンプル、ブラジル産 3 サンプル）、飼料用大豆粕（アメリカ・ブラジル産混合）1 サンプルについて検量線を引き、測定を行った。その結果、食用丸大豆および加工大豆では 5 成分は検出限界未満であった。しかし、飼料用丸大豆および大豆粕ではサンプル毎に Gly、Glu および Glu-A の定量限界以上で定量でき、定量値を得た。ガイドラインにおいて飼料用大豆の Gly の基準値は Gly-A との総和で 9 mg/L と定められているため、基準値を下回る結果を示した。また、日本において飼料用大豆中の Glu は基準値が定められていないため、食用大豆の基準値以上となる結果を示した。

定量結果から、アメリカで生産されている大豆は Gly 耐性 CP4EPSPS（アセチル化体を生成しない）×Glu 耐性アセチル化酵素のハイブリッド型大豆が主流となっており、ブラジルでは Gly 耐性 CP4EPSPS が主流になっていることが示唆された。さらに、飼料用大豆から Glu-A を定量した報告はない。本研究の分析法において大豆への適用性が示唆された。

5. 考察

Gly、Glu およびその代謝物は構造中にリン酸基やカルボキシ基を持つことから高極性を示す。この性質により抽出精製に時間を要すことやイオン化効率が悪く感度が低いといった問題がある。従来法においても有害な有機溶媒や煩雑な操作が必要であった問題点があった。本研究では、MTBSTFA を用いた固相誘導体化 LC-MS/MS 法によって大豆中のグリホサート、グルホシネートおよびそれら代謝物の迅速で簡便で、有害溶媒を用いない分析法の開発を行った。本研究では移動相や LC カラム、イオン化条件等の LC-MS/MS 条件

の検討、除タンパクや夾雑成分の除去等の前処理を検討し、感度や精度について最適化を行った。また、最適化した固相誘導体化法を用いることで、加水分解の防止や迅速性を向上させるとともに、測定対象物質を高極性から低極性化することで再現性の向上、高感度化を行うことで高倍率希釈によるマトリックスの大幅低減を可能にした。最適化した条件で添加回収試験を行ったところ、平均回収率 97-108%、併行精度 2-5%、室内再現精度 4-9%を示す良好な結果を示したため、本分析法の妥当性を確認した。

開発した分析法を各国の食用丸大豆、食用加工大豆および飼料用大豆に適用したところ、飼料用大豆においてサンプル毎に Gly、Glu、Glu-A の定量値を確認した。定量結果から、アメリカで生産されている大豆は CP4EPSPS が導入されている Gly 耐性×アセチル化酵素が導入されている Glu 耐性のスタック品種が主流となっており、ブラジルでは CP4EPSPS 導入の Gly 耐性が主流になっていることが示唆された。さらに、飼料用大豆から Glu-A を定量した報告はない。以上のことから、本分析法の信頼性や適用性を示した。

本分析法は迅速、簡便かつ信頼性のある分析法であり、基準値監視のモニタリングや原材料の品質管理の有用的な方法として期待される。今後は定量値を確認した大豆の遺伝子解析や大豆以外の GM 作物としてトウモロコシ、ナタネ等の Gly、Glu およびそれらの代謝物の一斉分析法を開発するとともに更なる迅速化と再現性の向上を求めて全自動固相抽出-LC-MS/MS によるオンライン測定を行うことを目指している。

D. 結論

課題 1 残留農薬等分析における試料調製方法の検討

[1] 農産物における試料調製方法及び試料の均質性が分析結果へ与える影響の検討

農薬が残留したほうれんそうを用いて均質化状態が異なる試料を調製し、分析結果に与える影響を調査した。その結果、均質化が不十分な試料

での分析値は、微細な均質化試料と比較して相対的に低くなり、試料の不十分な均質化状態は残留農薬濃度を過小評価する可能性があることが示唆された。なお、均質化が不十分な試料で分析値が低くなる傾向は、昨年度のトマトを用いた調査と一致する。凍結粉碎した試料は常温で均質化した試料よりも分析値の変動が生じにくいとの報告もあるが、本研究結果からは凍結粉碎法による均質性の向上は認められなかった。ほうれんそうは比較的的分析値の変動が小さいことから、均質化が困難な作物を使用した調査を実施し、さらなる情報の蓄積が必要である。各均質化試料の篩通過率から、ほうれんそうにおける十分均質な試料の目安は「目開き 1 mm の篩に負荷したときの通過率が 90%以上」と考えられた。なお、この目安は昨年度行ったトマトでの調査結果と合致した。

[2] 畜水産物における試料調製方法の検討

水産物を対象に液体窒素及びドライアイスを用いた凍結粉碎法による試料調製を検討した。あゆ及びえびは、検体の大きさを 1 cm 角以下にした方がよいものの、昨年度確立した畜産物の方法を適用できることが示された。一方、うなぎ及びさけでは、凍結粉碎法で粉碎しても大きい皮や骨が認められ、均質化が不十分と考えられた。試料粒子の大きさは抽出効率や分析値のばらつきに大きく影響する可能性がある。今後、本方法を改良し、均質性を向上させるとともに、試料粒子の大きさによる抽出効率や分析値のばらつきへの影響を検討する必要があると考えられた。

課題 2 公示試験法の精製操作の簡便化・迅速化及び自動化に向けた検討

通知一斉試験法「GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）」の精製操作を改良し、簡便化・迅速化した。使用する溶媒量を削減するため、精製に供する抽出量を通知一斉試験法の 1/20 にした。抽出液をそのまま C18 ミニカラムに負荷し、アセトニトリル/水（9：1）で溶出することで、低極性夾雑成分を除去することができた。また、一段目の C18（30 mg）ミニカラムからの溶出液に塩

化ナトリウム溶液を混合後、二段目の C18（50 mg）ミニカラムで精製することで、高極性夾雑成分を除去することができたため、塩析を省略することができた。さらに、PSA ミニカラム精製を行うことで、酸性夾雑成分や C18 ミニカラム精製では除くことができなかった色素を除去することができ、茶のように色素が多い食品においてもグラフアイトカーボンミニカラムによる精製は不要であった。濃縮は、GC-MS/MS 装置の感度に応じ、最終試験溶液の濃縮倍率を変更する場合のみ行うこととした。一連の精製操作は自動前処理装置を用いて行った。以上により、操作時間が大幅に短縮しただけではなく、精製における溶媒・試薬の使用量を削減することができた。

玄米、大豆、キャベツ、ほうれんそう、ばれいしょ、りんご、オレンジ及び茶を用いて、151 化合物を対象に添加濃度 0.01 ppm で妥当性評価試験を行った。その結果、大豆では検討農薬の 87%、その他の食品では 93%以上で妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした。なお、極性が比較的高い農薬は、二段目の C18 ミニカラムでの負荷・洗浄の際に溶出し、真度が低くなる傾向が見られたが、これらの農薬は昨年度確立した LC-MS/MS を用いた一斉分析法で分析が可能である。本分析法は、抽出方法を変更していないため、通知一斉試験法と同等と認められ、規格基準の適否判定に用いることができる方法である。加えて、本精製操作は自動前処理装置で行うことができるため、検査担当者の熟練度等による個人差が生じにくく、検査の効率化が期待できる方法と考えられた。

課題 3 前処理と分析装置のオンライン化を目指した半自動分析法の確立

本研究では *N*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamid (MTBSTFA) による簡便で迅速な固相誘導体化を行い、大豆中の Gly、Gly-A 及び、Glu、Glu-A、MPPA の LC-MS/MS を用いた 5 成分一斉分析法の開発を行った。また、輸入大豆飼料への適用を検討した。本分析法は迅速、簡便かつ信頼性のある分析法であり、基準値監視のモニタ

リングや原材料の品質管理の有用的な方法として期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sasano R., Ito R., Kusumoto M., Sekizawa J., Akiyama H. Simultaneous determination of glyphosate, glufosinate, and their metabolites in honey using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and solid-phase extraction. *Anal. Sci.*, **39**, 1023-1031, 2023.
2. Sasano R., Sekizawa J., Saito I., Harano M., Katsumoto K., Ito R., Iwasakai Y., Taguchi T., Tsutsumi T., Akiyama H. Simultaneous Determination of Glyphosate, Glufosinate and their Metabolites in Soybeans using Solid-phase Analytical Derivatization and LC-MS/MS Determination, *Food Chem.*, X submitted.

2. 学会発表

1. 佐々野 遼一、伊藤 里恵、楠本真宏、関澤 純平、穂山 浩：LC-MS/MSによる蜂蜜中のグリホサート、グルホシネートおよびそれら代謝物の分析法の開発、第9回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム（2023年9月16日）
2. 曳埜忍、島田京佳、矢島 智成、飯島和昭、志田（齊藤）静夏：残留農薬分析における試料均質性の指標の検討～圃場で農薬散布して栽培したトマトを用いた調査～、日本食品衛生学会第119回学術講演会（2023年10月12日）
3. Hiroshi Akiyama, Yoshinari Suzuki, Tomoaki Tsutsumi: International Conference on Food Safety and 38th KoSFos Annual Meeting. (2023年11月30日)

4. 志田（齊藤）静夏：残留農薬検査における課題と展望－検査部位の国際整合化、試料調製法及び抽出法について－、第21回食品安全フォーラム（2023年12月8日）
5. 田口貴章：残留農薬等試験法の概要、日本薬学会 第144年会（2024年3月29日）
6. 原野幹久、佐々野 遼一、関澤 純平、勝本 叶香、伊藤 里恵、岩崎 雄介、穂山 浩：LC-MS/MSによる大豆中のグリホサート、グルホシネート及びそれら代謝物の分析法の開発、日本薬学会 第144年会（2024年3月30日）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし