

食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
令和 6 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、農薬を散布して栽培したブロッコリーを用いて粗大な固形物が残存する粗粉碎試料、固形物が微細な微粉碎試料及び凍結粉碎試料を調製し検討を行った。その結果、均質化が不十分で粗大な固形物を多く含む粗粉碎試料での分析値は微細な均質化試料よりも低くなる傾向が確認された。試験用篩を用いた試料均質性の評価では、微細に均質化された試料は目開き 1 mm 篩を約 90%通過可能であった。トマト及びハウレンソウと同様であったことから、これが十分な均質化状態の目安となると考えられた。また、「畜水産物における試料調製方法の検討」では、牛及び豚の肝臓に農薬等を添加後、常温磨砕法または凍結粉碎法により試料調製し、回収率を比較することで、凍結粉碎法による農薬等の減少抑制効果を検証した。その結果、常温磨砕法では酵素や試料成分との反応等により減少しやすい農薬等においても、凍結粉碎法を用いることで減少を抑制できる場合があることが示された。

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

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「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ（畜水産物）」の精製方法を簡便化し、より夾雑成分の除去効果の高い方法へ改良し、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、大豆中の Gly、Glu 及び代謝物の LC-MS/MS を用いた 5 成分一斉分析法のオンライン化を行った。またほうれんそうを対象として、LC-MS/MS を用いたネオニコチノイド系農薬 17 成分を一斉分析する方法を開発し、実試料への適用を試みた。試料中の各農薬が MRL または一律基準値(0.01 ppm)になるよう添加した添加回収

試験の結果、真度、併行精度、室内再現精度ともに概ね目標値に収まる良好な結果が得られた。本法を市販ほうれんそう 9 試料に適用し分析を行ったところ、本法は、ほうれんそう中のネオニコチノイド系農薬の分析法として適用可能であると示唆された。

本研究における本年度の研究体制

- ・田口貴章（国立医薬品食品衛生研究所 食品部・第一室長）[代表]
- ・志田静夏（国立医薬品食品衛生研究所 食品部・第三室長）[分担]
- ・穂山浩（星薬科大学 薬学部薬品分析化学研究室・教授）[分担]
- ・齋藤真希（国立医薬品食品衛生研究所 食品部）[協力]
- ・望月龍（国立医薬品食品衛生研究所 食品部）[協力]
- ・伊藤里恵（星薬科大学 薬学部薬品分析化学研究室）[協力]
- ・岩崎雄介（星薬科大学 薬学部薬品分析化学研究室）[協力]
- ・勝本叶香（星薬科大学 薬学部薬品分析化学研究室）[協力]
- ・原野幹久（星薬科大学 薬学部薬品分析化学研究室）[協力]
- ・野村昂聖（星薬科大学 薬学部薬品分析化学研究室）[協力]
- ・藤田優麻（星薬科大学 薬学部薬品分析化学研究室）[協力]
- ・佐々野僚一（星薬科大学大学院、アイスティサイエンス社）
- ・堤智昭（国立医薬品食品衛生研究所 食品部）[協力]
- ・菊地博之（国立医薬品食品衛生研究所 食品部）[協力]
- ・坂井隆敏（国立医薬品食品衛生研究所 食品部）[協力]

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】農産物を対象とした試料の均質性が分析結果に与える影響の評価と均質性評価指標の提案

令和4年度は果菜類のトマト、令和5年度は葉菜類のほうレンソウを供試作物とした。トマトにおいて、作物の不十分な均質化は分析値の正確度及び精度を低下させる可能性が示唆され、試料秤取量が少ないほどその影響は大きくなる傾向を確認した。ほうレンソウにおいても同様の傾向が確認されたが、トマトと比較して均質化状態及び秤取量の少量化が分析結果に与える影響は小さかった。また、両作物ともに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 篩に負荷した際の通過率が90%となること目安となると考えられた。本年度は、トマト及びほうレンソウと形質が異なる花野菜であるブロッコリーを供試作物として、同様の調査を実施した。

[2] 畜水産物における適切な試料調製方法の提案と凍結粉碎法の有用性の検証

畜産物において、凍結粉碎法による試料調製が農薬等の減少抑制に有効であるかを検証することを目的とした。残留農薬等検査においては、一般に常温磨砕法により試料調製が行われているが、一部の農薬等は試料調製の際に分解等により濃度が低下し、過小評価の原因となることが知られている。試料調製中の損失の主な要因には、試料成分への吸着、酵素や他の試料成分との反応による分解、光分解、揮散などがある。このうち、吸着や分解を抑制する方法としては、酸（リン酸、塩酸等）や緩衝液、抗酸化剤などを添加して試料調製する方法があるが、一斉分析法においては他の農薬等の安定性への影響や抽出効率の低下等が懸念される。一方、ドライアイスや液体窒素を用いた凍結粉碎によって試料調製する方法は、他の農薬等の安定性や抽出効率に影響することなく、試料調製中の農薬等の分解等を抑制できる可能性が高い。そこで本研究では、常温磨砕法によって生じる農薬等の減少が、凍結粉碎法によってどの程度抑制されるかを検討し、凍結粉碎法の有用性を検証した。

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「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）」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、ネオニコチノイド系農薬は、ニコチンに類似した構造を持つ殺虫剤であり、国内外で広く使用されている。農薬・作物ごとに MRL（残留基準値）が設定され、MRL を超えた作物の販売や流通は禁止されている。近年日本で輸出入された農作物において MRL を上回るネオニコチノイド系農薬が検出された違反事例が報告されており、食品の安全確保に向けた簡便かつ迅速な分析法の開発が必要となっている。

公定法の分析は煩雑で前処理に時間を要することや、使用する溶媒量が多いこと等への懸念があり、これらを改善した迅速で簡便な一斉分析法が必要とされている。ほうれんそう中の複数のネオニコチノイド系農薬を同時分析した例は存在するが、日本の MRL を反映した例はないため、本研究では日本におけるほうれんそうの MRL に沿った分析法の開発を行った。ほうれんそうから残留農薬分析の前処理に一般的に用いられる方法である QuEChERS 法の抽出法と固相抽出法を組み合わせた方法を用いて抽出・精製を検討した。そして LC-MS/MS を使用し、ネオニコチノイド系農薬とそれらの代謝物 17 成分を一斉分析する方法の開発を試みた。

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）
- ・亀山 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 準教授）
- ・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）
- ・林 亜紀子（消費者庁 食品衛生基準審査課 残留農薬等基準審査室 室長）
- ・中村 俊輔（消費者庁 食品衛生基準審査課 残留農薬等基準審査室 専門官）
- ・正木 紀子（消費者庁 食品衛生基準審査課 残留農薬等基準審査室 審査官）
- ・渡辺 寿子（消費者庁 食品衛生基準審査課 残留農薬等基準審査室 専門官）
- ・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6年7月10日（木）（オンライン）
- ・令和7年2月14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】農産物を対象とした試料の均質性が分析結果に与える影響の評価と均質性評価指標の提案

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、フルベンジアミド、ペルメトリン。

2. 供試試料

作物名：ブロッコリー

分析部位：花蕾（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. 試料均質化状態の評価

4.1. 常温での均質化時間の比較

市販品ブロッコリーを蕾と茎に切り分けそれぞれ細切した。それらをミキサーに移し、常温条件で0.5, 1, 2及び4分間均質化したものの一部をシャーレに分取し、その状態を観察した。

4.2. 凍結粉碎試料の調製

市販品ブロッコリーを4.1項を同様の方法で蕾と茎に分けて細切した後、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(試料0.5倍量)を粉碎しパウダー状にし、凍結したブロッコリー試料に加え混合した。続いて、ドライアイスで予冷したミキサーに、ドライアスを混合した凍結ブロッコリー試料の約半量を予冷した入れ、数秒間均質化した。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、完全に密閉しない状態で冷凍庫に入れ、1晩かけてドライアスを昇華した。

4.3. 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

市販のブロッコリーを4.1項と同様の方法で蕾と茎に分けて細切した後、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』及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、4.2項と同様の方法で『凍結粉碎試料』を調製した。調製した微粉碎試料または凍結粉碎試料250gを目開き1mm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。また、粗粉碎試料250gを目開き1mmま

たは 2 mm 篩に負荷し、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。

5. 各検討に用いる分析用試料の秤取

5.1 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、微粉碎試料及び凍結粉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 及び 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。

5.2 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及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。

6 部位別の残留濃度の比較

圃場施設で栽培した処理区試料 1.2 kg を 4.1 項と同様の方法で蕾と茎に分けて細切し、それぞれの部位ごとの重量を測定した。各部位ごとにミキサーで 4 分間均質化した後、各均質化試料の中層から、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。

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] 畜水産物における適切な試料調製方法の提案と凍結粉砕法の有用性の検証

1. 食品

牛の筋肉 (オーストラリア産)、牛の肝臓 (国産) 及び豚の肝臓 (国産) はインターネットを介して購入した。

2. 装置

粉碎機は Robot Coupe BLIXER-3D (エフ・エム・アイ製) を用いた。

3. 試験溶液の調製

(1) 抽出

抽出は、通知一斉試験法「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)」に従って行った。

(2) 自動前処理装置を用いた精製

精製は分担課題 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」で開発した

自動前処理装置を用いた方法で行った。

4. 農薬等の添加後放置時間の回収率への影響の検討

牛の筋肉、牛の肝臓及び豚の肝臓の常温磨砕試料を用いて、農薬等の添加後放置時間の回収率への影響を以下のように検討した。検討対象は 65 化合物とした。

5. 試料温度の回収率への影響の検討

常温試料における回収率及び凍結試料における回収率を求めた。

6. 試料調製方法による回収率への影響の検討

凍結粉砕法により均質化した試料 10.0 g を量り採り (5 個)、「3. 試験溶液の調製」に従って分析を行った。なお、定量はマトリックス検量線法により行った。また、常温磨砕法により均質化した試料 10.0 g を量り採り (5 個)、「5. 試験溶液の調製」に従って分析を行った。なお、農薬等を添加後、抽出溶媒を加えるまでの時間は 30 分であった。なお、定量はマトリックス検量線法により行った。

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。

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

牛筋肉 (モモ肉)、牛肝臓、牛脂肪及び牛乳はインターネットを介して購入した。牛筋肉、牛肝臓及び牛脂肪は磨砕装置を用いて細切均一化したものを用いた。

2. 分析対象化合物

動物用医薬品標準溶液は林純薬工業製の PL 動物薬 LC/MS Mix 1 及び Mix 2、富士フイルム和光純薬製の動物用医薬品混合標準液 (マクロライド) 並びに動物用医薬品混合標準液 (ホルモン剤) を用いた。

3. 試験溶液の調製

(1) 抽出

抽出は通知一斉試験法「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）」に従って行った。

(2) 精製

次の操作を、自動前処理装置を用いて行った。C18-50 ミニカラム 2 個をノズルを挟んで連結した。これにアセトニトリル 1 mL を負荷し、コンディショニングした後、ノズルから水 0.2 mL を注入しながら、アセトニトリル/水 (9/1) 1 mL を負荷し、コンディショニングした。続いてノズルから水 0.4 mL を注入しながら、抽出液 2 mL を負荷した後、ノズルから水 0.2 mL を注入しながら、アセトニトリル/水 (9/1) 0.5 mL を負荷し、溶出した。得られた溶出液を 0.1 vol% ギ酸で 4 mL に定容し、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

アセタミプリド、イミダクロプリド、ジノテフラン、チアメトキサム、クロチアニジン、チアクロプリド、チアクロプリド-アミド、フロニカミド、TFNG、TFNA、ニテンピラム、CPMA、CPMF、スルホキサフロル（異性体混合品）、エチプロール、フィプロニル、フルピラジフロル。

2. 測定装置および LC-MS/MS 最適条件

分析法の開発にあたり、高速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。高速液体クロマトグラフ部分は全て島津製作所社製でポンプは LC-30AD 等、タンデム質量分析計部は島津製作所社製の LCMS-8060 を使用した。分析用のカラムは InertSustain ODS-3 (150 mm × 2.1 mm, 3 μm, GL Sciences 製) を使用した。注入する試料と移動相の初期濃度の溶媒組成比の違いを緩和すべく、オートサンプラーの共注入設定を用いて 4 μL の注入に伴い 40 μL の水を共注入した。移動相の流速は 0.2 mL/min で、B conc. 5% (0-1 min) -99% (13-20 min) -5% (20-30 min) のグラ

ジエント溶出で測定した。MS/MS は ESI (エレクトロスプレーイオン化 (Electrospray ionization)) 法でイオン化し、フィプロニルはネガティブモード、その他の成分はポジティブモードを用いて MRM (多重反応モニタリング (Multiple reaction monitoring)) で測定した。

3. 抽出

ほうれんそうを液体窒素で凍結させ粉砕機を用いて粉砕し、10 g を量りとした。アセトニトリル 10 mL を加え、振とうした。続いて混合塩 2.5 g を加え、振とうした。さらに硫酸マグネシウム 4.0 g を加え、振とうした後、遠心分離しその上澄液を試料抽出液とした。

4. 精製

固相カートリッジは PBX-20 mg、PSA-30 mg、PBX-20 mg の順番で連結した。アセトン及びアセトニトリルを順次通液してコンディショニングを行った。一番下に連結した PBX-20 mg を外し、PBX-20 mg、PSA-30 mg を連結したものに、抽出液の上相 500 μL を分取して負荷した後、アセトニトリル水溶液 500 μL を通液した。溶出液はすべて試験管にとり、超純水 500 μL を加えた。コンディショニングの後に外した PBX-20 mg に、試験管内の溶液を全量負荷し、溶出液は上と異なる試験管で受けた。元の試験管にアセトニトリル水溶液 500 μL を加え、固相カートリッジに試験管内の溶液を全量負荷した。溶出液は 2 つ目の試験管で受け、全量 2 mL を測定用溶液とした。

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。

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] 農産物を対象とした試料の均質性が分析結果に与える影響の評価と均質性評価指標の提案

1. 圃場試験の概要

茨城県で露地栽培されたブロッコリーに 7 種の農薬製剤を 2 回混用散布した後、最終散布 1 日後

に採取した花蕾を供試試料とした。供試試料の平均個体重量は約 279 g 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。

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り、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、選択性に問題は認められなかった。

市販品の微粉碎試料に各分析対象農薬を 0.01 mg/kg 添加した試料からの平均回収率は、89～109%であり、その併行相対標準偏差 (RSDr) は 6%以下であった。0.5 mg/kg 添加試料での平均回収率は、87～104%であり、RSDr は 5%以下であった。ジノテフラン等の 5 mg/kg 添加試料、及びダイアジノンの 15 mg/kg 添加試料からの平均回収率と RSDr も規定の範囲内の結果であった。

3. 試料均質化状態の評価

3.1. 均質化時間及び均質化温度の比較

均質化時間が長くなるに伴い固形物が微細になり、繊維質が多く硬い茎より、比較的柔らかい蕾の方が短時間の均質化でも微細になりやすいことを確認した。観察結果から、0.5 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ることを確認した。また、試料温度は、均質化前の細切した凍結状態で -11.2°C であった。その後、ドライアイスの添加により温度計の計測可能下限温度である -50°C まで低下し、ミキサーでの均質化後の試料温度も変わらず -50°C であった。冷凍庫内でのドライアイス昇華後では -18.1°C まで上昇

した。均質化後の試料は -50°C 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。

3.2. 均質化評価用試験篩の目開き及び通過手法の比較

均質化したブロッコリー試料のヘラ処理後における平均通過率 (作業者間の通過率の差) は、粗粉碎試料の 1 mm 篩で 7% (4%)、2 mm 篩で 36% (8%)、微粉碎試料の 1 mm 篩で 41% (10%)、凍結粉碎試料の 1 mm 篩で 19% (6%) であった。流水洗浄処理における平均通過率 (作業者間の通過率の差) は、粗粉碎試料を 2 mm 篩、微粉碎試料を 1 mm 篩、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 81% (0%)、89% (1%)、94% (0%) となった。一方、粗粉碎試料の 1 mm 篩負荷時では、洗浄時間 8 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。これは、篩の網目に粗大な固形物が目詰まりした状態で流水による洗浄を実施したことで、水が篩上に保持され残渣重量が増加した結果である。

ヘラ処理と流水洗浄処理の各篩通過手法を比較すると、粗粉碎試料の 2 mm 篩及び微粉碎試料及び凍結粉碎試料の 1 mm 篩における平均通過率は、ヘラ処理よりも最終洗浄時間での流水洗浄処理で 45%以上高くなった。これは、ヘラ処理で篩を通過できなかった篩の網目等へ付着した微細な残渣が、流水洗浄処理では洗い流せることに起因すると考えられた。しかし、粗粉碎試料の 1 mm 篩負荷時での通過手法による平均通過率の差は 2%とわずかであり、流水洗浄処理よりもヘラ処理で高くなった。負荷試料が粗大かつ篩の目開きが細かい場合は、篩の網目の目詰まりにより流水洗浄処理時においても微細残渣の通過が阻害されている可能性が考えられた。

以上の結果から、ヘラ処理よりも流水洗浄処理の方が、本来、篩に残らない 1 mm 未満の微細な残渣を正確に通過させることが可能であり、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。そして、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 89%、凍結粉碎試料で 94%であることから、微細に均質化された試料は参考規定^{5,6)}で示される目開き 1 mm 篩を約 90% 通過可能であった。

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、粗粉碎、微粉碎及び凍結粉碎試料について比較した。

同一散布条件での農作物中の各農薬の残留レベルは、散布液中の農薬濃度に依存するため、各農薬の分析値をそのまま総合解析は困難である。また、分析試料量の少量化は、分析値の真度のブレや精度の低下を招くことが知られている。そこで、分析試料秤取量の影響を横断的に評価するために、微粉碎試料での 20 g 秤取時の平均濃度に対する各農薬及び 7 種農薬全体での平均相対濃度を求めた。

各農薬における平均相対濃度は、微粉試料>凍結粉碎試料>粗粉碎試料の順で低くなる傾向を示した。特に、粗粉碎試料におけるマラチオンでは、微粉試料及び凍結粉碎試料よりも顕著に低くなった。マラチオンの相対濃度が、粗粉碎試料において低くなる傾向は、トマト及びホウレンソウを供試作物とした場合にも確認されている。さらに、7 種農薬全体で評価した際の平均相対濃度も個別農薬と同様に微粉試料>凍結粉碎試料>粗粉碎試料の順で低くなる傾向を示した。

粗粉碎試料、微粉碎試料及び凍結粉碎試料における各農薬の分析値の変動 (RSD 値)は、どの試料でも 10%以下であり、均質化の程度及び秤取量を与える影響は不明瞭であった。そこで、包括的な変動評価を実施するために、各農薬の検体 20 g 秤取時の分析値で補正した相対濃度の全農薬での総平均 RSD 値 を算出した。総平均 RSD 値は、微粉試料<凍結粉碎試料<粗粉碎試料の順に大きくなる傾向を示し、微粉試料及び凍結粉碎では秤取量が少なくなるほど大きくなった。

5. 遠心分離後の沈殿物と上澄み液の比較

分取した粗粉碎試料及び微粉試料をそれぞれ遠心分離したが、沈殿と上澄み液に分離しなかったため、両画分中における農薬濃度の分別分析は実施できなかった。これまでの研究に供試したトマト及びホウレンソウの水分含有率は、それぞれ 94.0%及び 92.4%であるのに対してブロッコリーでは 86.2%と低い。そして、ブロッコリーの組織体は比較的保水性が高く、均質化の過程で細胞外に溶出する水分量が少ないため、遠心分離による分別が困難であったと考えられる。

6. 部位別の残留濃度の比較

各部位での農薬濃度にそれぞれの部位の重量を乗じて重量に換算した。農薬重量の各部位での比率から、ブロッコリーの 1 個体における各部位への農薬分布率を算出した (Fig. 11)。蕾と茎の重量比は 43:57 であり、個体中では茎の占める割合が蕾よりもわずかに多かった。一方で、各農薬の分布率は、蕾において 98~100%となり、農薬の種類に関わらずほとんどが蕾に分布していた。ブロッコリーは蕾が傘状で、且つ葉が茎を覆う形状であり、散布された農薬は主に蕾と葉部に付着し、茎には付着しなかったと考えられる。この結果より、高濃度で農薬が残留する蕾の分析試料への秤取割合が、分析値の変動に影響を与えられられる。

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] 畜水産物における適切な試料調製方法の提案と凍結粉碎法の有用性の検証

1. 農薬等の添加後放置時間の回収率への影響

常温磨砕法により調製した試料中で農薬等がどの程度減少するかを検討するため、牛の筋肉、牛の肝臓及び豚の肝臓の常温磨砕試料に農薬等を添加後、室温で放置し、放置時間による回収率への影響を検討した。添加後の放置時間は 0, 15, 30, 60 分とした。検討対象化合物は 65 化合物とした。いずれの化合物も抽出液に添加した場合の回収率は 80%以上であり、精製以降の操作での損

失はほとんどないものと考えられた。放置時間 30 分で回収率が 70%未満となった化合物は、牛の筋肉では 4 化合物、牛の肝臓では 12 化合物、豚の肝臓では 14 化合物であり、いずれかの食品で 70%未満となった化合物は 16 化合物であった。また、牛と豚の肝臓では試料中の酵素やその他の成分の違いにより、農薬等の分解等のしやすさが異なることが示唆された。いずれかの食品で 30 分後の回収率が 70%未満となった 16 化合物のうち、放置時間 0 分と 30 分の回収率に有意差 (Benjamini-Hochberg 法による FDR (false discovery rate) 補正後の q 値 <0.01) が認められた化合物は、牛の筋肉ではなかったが、牛の肝臓では 8 化合物、豚の肝臓では 14 化合物であった。これらの化合物は放置時間中に試料中の酵素やその他の試料成分との反応等により減少したものと考えられた。一方、牛筋肉中の Cefapirin や Neospiramycin 等、放置時間 0 分と 30 分の回収率に有意差が認められなかった化合物は添加直後に分解等が生じたか、抽出操作中の損失が考えられた。

2. 試料温度の回収率への影響

試料温度が回収率に与える影響を評価するため、常温磨砕により調製した試料 (常温試料) 及び凍結粉砕により調製した試料 (凍結試料) に農薬等を添加し、それぞれ室温または -30°C で 30 分間放置後、抽出操作を開始し、得られた回収率を比較した。牛の筋肉の常温試料で回収率が 70%未満となった化合物は Cefapirin 等 4 化合物であったが、いずれも凍結試料の回収率との有意な差 ($q<0.01$) は認められなかった。このため、これらの化合物は試料を低温にしても回収率の低下を抑制することは困難であると考えられた。

牛の肝臓の常温試料で回収率が 70%未満となった化合物のうち、Ethopabate 等 8 化合物は、いずれも凍結試料の回収率と有意な差 ($q<0.01$) が認められ、試料を低温にすることにより回収率が向上した。しかしながら、常温試料で回収率が 70%未満となった化合物のうち、Cefapirin 等 5 化合物は凍結試料においても回収率が 70%未満に

とどまったことから、一部の化合物では試料を低温にしても、回収率の低下を完全には抑制することはできないことが示唆された。

豚の肝臓で、牛の肝臓と同様に、常温試料で回収率が 70%未満となった化合物のうち、2-Acetylamino-5-nitrothiazole 等 12 化合物は、いずれも凍結試料の回収率と有意な差 ($q<0.01$) が認められ、試料を低温にすることにより回収率が向上した。しかしながら、常温試料で回収率が 70%未満となった化合物のうち、Cefapirin 等 6 化合物は凍結試料においても回収率が 70%未満にとどまったことから、牛の肝臓と同様に、一部の化合物では試料を低温にしても、回収率の低下を完全には抑制できないことが示唆された。

以上の結果から、牛及び豚の肝臓においては一部の農薬等を除き、試料温度を下げることにより、放置中に生じる農薬等の減少を抑制できることが示された。したがって、凍結粉砕法による試料調製を行えば、試料調製中の農薬等の減少を抑制できる可能性が高いことが示唆された。

3. 試料調製方法による回収率への影響

凍結粉砕法による試料調製の農薬等の減少抑制効果を検証するため、試料調製前の検体 (牛及び豚の肝臓) に農薬等を添加後、凍結粉砕法または常温磨砕法により試料調製し、得られた回収率を比較した。検討対象化合物は、「2. 試料温度の回収率への影響」で、牛または豚の肝臓において常温試料で低回収率 ($>70\%$) となった化合物の中から 11 化合物 (Group 1) 及びいずれの食品においても良好な回収率 ($>70\%$) が得られた化合物の中から 10 化合物 (Group 2) を選定した。なお、常温磨砕法の場合は、検体に農薬等を添加後、抽出操作を開始するまでの時間が 30 分となるようにした。Group 2 の農薬等については、常温磨砕法及び凍結粉砕法のいずれで試料調製を行っても 70%以上の回収率が得られ、試料調製中の大きな減少は見られなかった。一方、Group 1 の農薬等では、常温磨砕法で試料調製を行うと回収率が 70%以下となり、ほとんどの農薬等において「2. 試料温度の回収率への影響」で常温試料に添加し

た場合と比較して回収率が低下した。これは農薬等を試料調製前に添加したことで、試料中の酵素や試料成分と接触しやすくなり、分解等が進行したためと考えられた。凍結粉碎法で試料調製した場合も、Group 1 の一部の農薬等では凍結試料に添加した場合と比べて回収率が低下した。一般に、農薬等の分析法の妥当性を添加回収試験によって評価する際には、試料調製から抽出開始までの間に生じる減少を考慮して評価するため、農薬等を試料に添加後、30 分間放置した後に抽出を開始する方法が用いられる。しかし、本検討結果から、均質化後の試料に農薬等を添加して 30 分間放置した場合よりも、試料調製中の減少の方が大きい場合があることが示された。したがって、添加回収試験で良好な回収率が得られた方法を用いても、実際の検査においては残留濃度を過小評価する可能性があると考えられた。

牛の肝臓中の 2-Acetylamino-5-nitrothiazole 等 5 化合物、豚の肝臓中の 2-Acetylamino-5-nitrothiazole 等 6 化合物は、検体に添加後、常温磨砕法により試料調製した場合、低回収率（70%未満）であったが、凍結粉碎法により試料調製することによって回収率が 70%以上となり、統計的な有意差（ $q < 0.01$ ）が認められた。

一方、牛の肝臓中の Tetrachlorvinphos 及び豚の肝臓中の Propoxur は、凍結粉碎法により回収率が改善したものの、回収率は 60%台であり、十分に減少を抑制することはできなかった。また、牛の肝臓中の Azamethiphos 等 5 化合物、豚の肝臓中の Azamethiphos 等 4 化合物は凍結粉碎法においても回収率が 40%未満であり、試料調製中の減少を抑制することができなかった。これらは Azamethiphos（牛及び豚の肝臓）及び Ethopabate（牛の肝臓）を除き、凍結試料に添加した場合も低回収率であり、抽出液に添加した場合はいずれの化合物も回収率が良好（ $> 80\%$ ）であったことから、Azamethiphos 及び Ethopabate を除き、試料調製中に加え、抽出操作中においても損失が生じている可能性が考えられた。特に、極性が高い Cefapirin は抽出溶媒であるアセトニトリルやヘキ

サンへの溶解性が低く、牛の筋肉の凍結試料に添加した場合も低回収率となったことから、抽出段階での損失が低回収率の主要原因であることが示唆された。

以上の結果から、牛及び豚の肝臓において、常温磨砕法による試料調製では農薬等が酵素や試料成分との反応等により減少しやすい化合物であっても、凍結粉碎法による試料調製を行うことで減少を抑制できる場合があることが示された。ただし、凍結粉碎のみでは減少を十分に抑制できない化合物も存在するため、試料調製方法や抽出条件の検討を含めた対応が必要であると考えられた。

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. 試験溶液調製方法の検討

(1) ミニカラムの検討

本検討ではキノロン剤、サルファ剤、ホルモン剤、マクロライド系抗生物質等の 54 化合物を対象とした。抽出は通知一斉試験法「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）」に従って行った。本試験法の抽出方法はヘキサン及びアセトニトリルの混液を用いてホモジナイズ抽出し、ヘキサン層を除去してアセトニトリル層を採取する方法であるため、大部分の脂質は抽出時に除去される。しかしながら、抽出液中にも低極性夾雑成分が多く含まれていることから、通知一斉試験法と同様に、 C_{18} ミニカラムを用いて低極性夾雑成分を除去することとした。使用する有機溶媒量を削減するため、精製に供する抽出液量は 2 mL（試料 0.2 g 相当）とし、充填剤量 50 mg の C_{18} ミニカラム（C18-50）を用いることとした。通知一斉試験法ではミニカラムへの負荷前に溶媒を除去し極性の高い溶媒に置換するが、操作の簡便化の観点から、そのような操作は行わない方が望ましい。また、負荷液中の夾雑成分に対して充填剤量が不足すると過負荷となり、精製効果が低

下する恐れがある。このため、ミニカラムを2個用いた2段精製を検討した。すなわち、抽出液（アセトニトリル溶液）を希釈や濃縮をせずにそのまま1段目のC18-50ミニカラムに負荷することで脂質成分を概ね除去し、2段目のカラムでノズルから水系溶媒を加えることにより溶媒の極性を上げて様々な夾雑成分を除去することとした。2段目のミニカラムにはC18-30, C18-50, PBX, PLS-3, AXi及びPSAを検討した。

予備検討として、牛筋肉のブランク抽出液に混合標準溶液を0.01 µg/mL (0.1ppm 相当) となるように添加し、種々のミニカラムでの回収率及びマトリックスの影響を求めた。その結果、2段目にもC₁₈ミニカラム (C18-30 又は C18-50) を用いた場合、ほとんどの化合物において良好な回収率が得られた。その他の種々の検討の結果から、牛筋肉で良好な結果が得られたC18-30, C18-50, AXi及びPSAミニカラムについて牛肝臓、牛脂肪及び牛乳での回収率及びマトリックスの影響を確認した。その結果、マトリックスの影響を補正した回収率はいずれのミニカラムを用いた場合も概ね良好で、マトリックスの影響は、牛肝臓ではAXi、牛脂肪及び牛乳ではC18-50で小さく、精製効果が高いことが示唆された。これらの結果から、本研究では1段目と2段目の両方にC18-50を用いることとした。

(2) ノズルから加える水の量の検討

①抽出液負荷時の水量

「(1) ミニカラムの検討」では、1段目のC18-50ミニカラムに抽出液を負荷する際、ノズルから水を0.4 mLを加え、1段目のミニカラムからの溶出液を希釈して2段目のC18-50ミニカラムに負荷した。この時、ノズルから加える水の量を増加させれば精製効果が向上する可能性があると考え、水量を0.8 mLに増加させた場合の回収率および精製効果を検討した。その結果、水量を増加させても回収率の低下は認められなかった。しかし、マトリックスの影響については、水0.4 mLを用いた場合と比較して改善がみられず、抽出液負荷時にノズルから加える水の量を増加させても精製

効果の向上は期待できないことが示唆された。これらの結果から、抽出液負荷時にノズルから加える水の量は0.4 mLとした。

②アセトニトリル/水 (9/1) での溶出時の水量

「(1) ミニカラムの検討」では、1段目のC18-50ミニカラムに抽出液を負荷した後、アセトニトリル/水 (9/1) 0.5 mLで溶出する際に、ノズルから水0.2 mLを加え、1段目のミニカラムからの溶出液を希釈して2段目のC18-50ミニカラムに負荷した。この時も、ノズルから加える水の量を増加させることで、精製効果が向上する可能性があると考え、水量を0.4 mLに増加させた場合の回収率及び精製効果を検討した。その結果、水0.2 mLを加えた場合と比べて特段の改善がみられなかった。このため、1段目のC18-50ミニカラムからアセトニトリル/水 (9/1) で溶出する際にノズルから加える水の量は0.2 mLとした。

(3) 確立した精製方法

確立した精製方法では、1段目のC18-50ミニカラムに抽出液（アセトニトリル溶液）をそのまま負荷し、アセトニトリル/水 (9/1) で溶出することにより、低極性夾雑成分が多く含まれる牛脂肪のような試料においても目詰まりを防ぎ、低極性夾雑成分を効果的に除去することができた。また、2段目のミニカラムへの過負荷を防ぎ、精製効果の低下を抑制できたと考えられる。さらに、1段目と2段目のC₁₈ミニカラムの間にノズルを配置し、ノズルから水を注入して溶出液を希釈し、極性を高めた溶液を2段目のミニカラムに負荷する方法としたことにより、2段目のミニカラムでの精製効果が向上したものと考えられた。

2. 妥当性評価

本研究で確立した自動前処理装置を用いた動物用医薬品一斉分析法の妥当性評価を、「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（食安発1224第1号，平成22年12月24日）」に従い実施した。牛筋肉、牛肝臓、牛脂肪及び牛乳を用い、添加濃度0.01 ppm、1名が1日1回2併行の試験を5日間実施する試験計画

とした。なお、「(1) ミニカラムの検討」で用いた 54 化合物のうちスルファニルアミドはピーク形状の不良により定量が困難であった。また、ゼラノールは感度が低く、ピーク面積の再現性が得られなかった。このため、上記の 2 化合物を除いた 52 化合物を評価対象とした。

評価対象化合物のいずれにおいても、ブランク試料におけるピーク面積は添加試料におけるピーク面積の 1/10 未満であり、選択性に問題はなかった。真度及び精度の目標値（真度 70～120%、併行精度 25%未満、室内精度 30%未満）を満たす化合物数（全化合物数に対する割合）は、牛筋肉で 45 (87%)、牛肝臓で 41 (79%)、牛脂肪で 48 (92%)、牛乳で 47 (90%) であり、本分析法により約 8 割以上の化合物を精確に定量できることが分かった。

ダノフロキサシンは全ての食品で真度が 120% を超過していた。マルボフロキサシンでは牛筋肉及び牛乳、オフロキサシンでは牛の肝臓及び牛乳において真度が 120%以上となり、マトリックス効果も比較的大きかった。エリスロマイシンについては、真度が目標値を下回り、かつ精度の不良傾向がみられた。エリスロマイシンは酸性溶液中での分解が報告されており、ギ酸を含む試験溶液調製後、LC-MS/MS に注入するまでに分解したことが低真度やばらつきの原因であると考えられた。牛肝臓においてロイコマイシン A5、ネオスピラマイシン I、スピラマイシン I、スルファキノキサリン及びタイロシンの真度が極端に低かった。いずれもマトリックスの影響は小さく、イオン化抑制が原因ではないと考えられた。スルファキノキサリンについては詳細な原因が不明であるが、熱変性させた牛肝臓においては真度が良好という報告から、肝臓における代謝機構の関与が示唆されている。クロステボルも牛肝臓において真度がやや低かった。また、ロイコマイシン A5、ネオスピラマイシン I、スピラマイシン I 及びタイロシンについては牛筋肉及び牛脂肪においても真度が 56～76%とやや低い値となった。これらもマトリックスの影響は小さく、抽出液に添加した場

合の回収率（マトリックスの影響を補正した回収率）は良好であったことから、試料に標準溶液を添加後の放置時間中または抽出操作中に減少したものと考えられた。チルミコシンに関しては真度が目標値を超過していたが、マトリックスの影響は小さいことから、原因は不明でありさらなる検討が必要である。

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。

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. MS/MS 条件の検討

17 成分それぞれの標準溶液を用いて MRM 条件の最適化を行った。検討の結果、フィプロニルではネガティブモード、その他の成分ではポジティブモードで良好な感度が得られた。

2. 移動相の検討

本研究でも先行研究と同様に水系移動相にギ酸を添加することとしたが、先行研究と同様の濃度である 0.1%のギ酸を添加したところ、TFNG、TFNA のピーク形状が不良であった。そのため、ギ酸濃度を 0.01%、0.02%、0.1%で添加した場合、またギ酸を添加しない場合で検討を行った。CPMF は 0.1%よりも 0.02%で良好なピーク形状が得られた。TFNG はギ酸を添加しない場合、0.01%、0.02%で添加した場合でそれぞれ複数のピークが見られ、ピーク形状も不良であった。TFNA は、ピーク強度が他のギ酸濃度の添加時に比べて低いものの、0.02%で添加した場合で最もテーリングやリーディング抑えられた。したがって、水系移動相は 0.02%ギ酸含有 0.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液、有機系移動相は 0.5 mM 酢酸アンモニウム・メタノール溶液を最適条件とした。

3. 絶対検量線による直線性の確認と定量限界の決定

最適化した LC 条件、MS 条件を用いて絶対検量線による直線性の確認を行った。17 成分の混合

標準液を用いて、1.25、2.5、5.0、10、20 µg/kg の範囲で検量線を作成し、決定係数を算出した。その結果、全成分で $R^2 = 0.9996$ 以上の直線性を示したため、直線性は良好であると判断した。また、検量線の下限值である 1.25 µg/kg を本分析法の定量限界値とした。

4. 固相カートリッジによる精製の検討

今回用いた方法は、アセトニトリルで目的成分の抽出を行ったのち、粉末の代わりに PSA や C₁₈ が充填された固相カートリッジを用いて精製を行う。精製方法の最適条件を検討するにあたり、カートリッジは PSA-30 mg、PSA-50 mg、PBX-20 mg、C₁₈-30 mg を用いた。抽出液（アセトニトリル相）を、PBX と PSA を連結した固相に負荷し、夾雑成分の除去と目的成分の溶出を行ったのち、アセトニトリル水溶液を通液することで目的成分の溶出を行った。

固相カートリッジについての検討は、ほうれんそうでの添加回収試験を行い回収率によって評価した。

極性が比較的低い色素を主に PB で除去する目的から、PBX は2個使用することとし、1個目の PBX に連結させるものとして、PSA-50 mg を用いて検討を行った。結果は5成分が目標値範囲外となった。希釈倍率が低いことによるマトリックス効果による影響と、陰イオン交換系である PSA にカルボキシ基を持つ TFNA、CPMA が相互作用し、固相に保持されたためであると考えた。

極性の低い色素の除去能を向上させるべく、PBX に連結させる固相カートリッジを PSA ではなく、無極性のシリカ系固相である C₁₈ を用いる方法を試みた。この方法では TFNG、TFNA を回収することが出来なかった。この理由として、C₁₈ の固相表面に存在する残留シラノール基とカルボキシ基が相互作用しているためであると考えた。

そのため、PBX-20 mg と C₁₈-30 mg の連結固相に抽出液を負荷・溶出したのち、洗浄液であるアセトニトリル水溶液に 2%ギ酸を加えて固相への

通液を行う方法を試みた。これにより TFNG、TFNA の回収率は改善したが、回収率が 120%以上となる成分が洗浄液に酸を加えなかった場合に比べて増加した。酸を加えると酸性の目的成分が回収しやすくなる一方で、目的成分だけでなく夾雑成分も固相から溶出され、夾雑成分によるイオン化の増強が起こることが考えられた。したがって、C₁₈ 固相カートリッジを用いることは適当でないと判断した。

再び PSA での検討を行い、PSA-30 mg を用いて回収率を算出した。15 成分が目標範囲内に収まり、概ね良好な結果が得られた。PSA の充填量を低下させたことで回収率が向上したことから、PSA を使用せず（PSA-なし）PBX のみで精製を行なう方法を試みた。PSA を使用しない場合、14 成分の回収率が目標範囲内に収まった。PSA-30 mg を用いた場合と PSA-なしの場合とで、回収率に大きな違いは見られなかった。

ほうれんそうへ各農薬成分の MRL 濃度相当の添加を行い、PSA-50 mg、PSA-30 mg、PSA-なしの場合で比較を行った。個別の MRL が設定されている成分とされていない成分では希釈の倍率が異なるため、個別の MRL が設定されている成分のみを対象とした。PSA-50 mg を用いた場合は 10 成分のうち 7 成分、PSA-30 mg を用いた場合は 9 成分、PSA-なしの場合は 4 成分で回収率が目標範囲内となった。PSA-30 mg を用いた場合と PSA-なしの場合において、0.01 mg/kg では回収率に大きな違いは見られなかったが、MRL 相当濃度の添加を行った際には PSA-なしの場合で 120%を超過する成分が多かった。PSA-なしの場合に比べ PSA を使用した場合の方が色素の除去能も高くなり、目的成分の回収と夾雑成分の除去を同時に行うことが可能となった。これらの結果から精製に使用する固相カートリッジは、PBX-20 mg と PSA-30 mg を連結したものと、単独の PBX-20 mg とした。

5. 抽出溶媒の検討

ほうれんそう中から目的の農薬成分を抽出する際に使用するアセトニトリルについて検討を行った。ほうれんそう 10 g 中で 0.01 mg/kg となるように標品を添加し、抽出溶媒のアセトニトリル 10 mL を加えたのち、ぎ酸原液 100 μ L 加えた。回収率は 10 成分で目標範囲内に収まったが、回収率が 120% 以上となる成分が増加していた。固相カートリッジの検討と同様に、酸を加えるとカルボキシ基を有する目的成分が回収しやすくなる一方で、夾雑成分もほうれんそう中から抽出されてしまい、イオン化の増強に繋がるという弊害が起きると考察した。

6. マトリックス効果の算出

添加回収試験で用いた有機栽培ほうれんそうを用いて ME (マトリックス効果 (Matrix effect)) の算出を行うため、抽出液への標準品の添加を行った。

0.01 mg/kg 相当の添加を想定した場合は、目標範囲内の回収率の成分が最も多く得られたのは PSA-なしの場合の 15 成分であった。

個別の MRL 濃度相当の添加を想定した場合には、固相カートリッジ PSA の種類ごとにマトリックス効果を算出したところ、目標範囲内の回収率の成分が最も多く得られたのは PSA-30 mg を用いた場合であり、全成分で目標範囲内に収まった。回収率も PSA-30 mg を用いた場合に良好であったため、使用する固相カートリッジは PSA-30 mg とした。

7. 妥当性評価試験

最適化した LC-MS/MS 条件、サンプルの前処理条件を用いて、厚生労働省のガイドラインに基づき妥当性評価試験を行った。測定対象物を含まないほうれんそうブランクを測定したところ、妨害するピークは検出されなかったため、選択性は十分であると判断した。

ほうれんそうへ添加した標準品の濃度は、MRL が設定されている成分については MRL 濃度、

MRL が設定されていない成分については一律基準である 0.01 mg/kg となるように添加した。

8. 妥当性の確認

得られたクロマトグラムから回収率を算出し、統計処理を一元配置分散分析で行い併行精度および室内再現精度を算出した。MRL が設定されている農薬成分について、フルピラジフロンを除く 9 成分の回収率が目標値範囲内となり、併行精度、室内再現精度は全成分で目標値を満たしていた。

MRL が設定されていない農薬成分について、回収率は 4 成分が目標値範囲内となり、併行精度は全成分、室内再現精度は CPMF を除く 6 成分が目標値を満たしていた。

以上のことから、MRL が設定されている成分、されていない成分それぞれにおいて概ねガイドラインの目標値範囲内に収まる良好な真度と精度が得られ、本分析法の妥当性が確認された。

9. 実試料への適用

本分析法を市販ほうれんそう試料の分析に適用した。国産のほうれんそう試料 A (有機栽培表示) (国産 A)、試料 B (冷凍) (国産 B)、試料 C (国産 C)、中国産の表記があるほうれんそう (冷凍) (中国冷凍) を分析対象とした。いずれも基準値以下であった。親化合物だけでなく代謝物も検出されたことから、代謝物を網羅した分析が必須であることが考えられる。以上のことから、本分析法はほうれんそうの実試料の分析に適用可能であると示唆された。

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] 農産物を対象とした試料の均質性が分析結果に与える影響の評価と均質性評価指標の提案

農薬を散布して栽培したブロッコリーを用いた調査の結果、均質化が不十分で粗大な固形物を多く含む試料での分析値は相対的に低くなった。

特にマラチオンでは、他の均質化試料と比較して顕著に低くなった。この傾向は、トマト及びハウレンソウを供試試料とした研究結果とも一致することから、不十分な均質化が分析結果に与える影響は、農薬の種類によって異なることが確認された。このように均質化の影響を受けやすい農薬については、試料の不十分な均質化が、残留農薬濃度の過小評価リスクを招くことが示唆された。これまで調査結果から、分析値の変動は、ハウレンソウ<ブロッコリー<トマトの順に大きくなり、変動の大小は作物種により異なることが確認された (Fig 12)。また、均質化の程度に関わらず、秤取量と分析値の変動は負の相関関係を示し、秤取量が少ないほど変動が大きくなることが確認された。そして、各均質化試料の篩通過率から、微細に均質化した試料の約 90%が目開き 1 mm 篩を通過することが確認されたことから、これが十分微細に均質化された試料の目安と位置付けた。なお、この均質化評価の目安は、トマト及びハウレンソウでの調査結果と合致した。

[2] 畜水産物における適切な試料調製方法の提案と凍結粉碎法の有用性の検証

畜産物における試料調製時の農薬等の減少について、常温磨砕法と凍結粉碎法での回収率の比較を通じて、凍結粉碎法による減少抑制効果を検討した。牛及び豚の肝臓を対象とした検討の結果、常温磨砕法により試料調製を行うと、試料中の酵素やその他の試料成分との反応等により、一部の農薬等では大幅な減少が生じた。一方で、凍結粉碎法による試料調製を行うことにより、農薬等によっては、これらの減少を抑制できることが示された。ただし、凍結粉碎のみでは減少を十分に抑制できない化合物も存在することから、留意が必要である。

一般に、分析法の妥当性を添加回収試験により評価する際は、農薬等を添加後 30 分間の放置を経て抽出操作を開始する方法が用いられる。この目的の一つは、試料調製から抽出までの間に生じる農薬等の減少を考慮して評価するためである。しかし、本研究の結果から、均質化後の試料に添

加し 30 分間放置した場合よりも、試料調製中に生じる農薬等の減少の方が大きくなる場合があることが示された。このため、添加回収試験において良好な回収率が得られたとしても、実際の検査においては残留濃度を過小評価する可能性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「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)」の精製操作を改良し、簡便かつ迅速な分析法を確立した。本分析法は通知一斉試験法に従って調製した抽出液を、自動前処理装置を用いて C₁₈ ミニカラム (充填剤量 50 mg) で 2 段階精製し、夾雑成分を除去した後、LC-MS/MS で測定する方法である。牛筋肉、牛肝臓、牛脂肪及び牛乳を用いて、52 化合物を対象に添加濃度 0.01 ppm で妥当性評価を行った結果、約 8 割以上の化合物で妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした。本分析法は、通知一斉試験法と抽出条件が同一であるため、抽出効率に起因する分析値の差異は生じず、規格基準への適否判定に用いることができる方法である。また、一連の精製操作は通知一斉試験法に比べ小スケールであり、使用する試薬及び溶媒の使用量を大幅に削減することができた。さらに、自動前処理装置を用いることで、操作時間を短縮でき、分析担当者の熟練度に依存しない精度の高い分析が可能であることから、分析の効率化が期待できる方法である。

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

ほうれんそうを対象として、LC-MS/MS を用いたネオニコチノイド系農薬 17 成分を一斉分析する方法を開発し、実試料への適用を試みた。基準値が設定されている農薬については、いずれも良好な選択性と直線性が得られ、真度、併行精度、室内再現精度ともに概ね目標値に収まる良好な結果が得られた。本法を市販ほうれんそう 9 試料に適用し分析を行ったところ、イミダクロプリド、

ジノテフラン、フロニカミドとその代謝物 2 成分、スルホキサフロル、フィプロニル、クロチアニジン、フルピラジフロロン等の農薬成分が各基準値内の濃度で検出された。本法は、ほうれんそう中のネオニコチノイド系農薬の分析法として適用可能であると示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sasano R, Sekizawa J, Saito I, Harano M, Katsumoto K, Ito R, Iwasaki 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, 2024; 24, Article 101806.
2. 田口貴章、堤智昭. 食品中に残留する農薬等有害物質の規制と試験法の現状と課題. Yakugaku Zasshi. 2025;145(2): 93-94.
3. 田口貴章. 残留農薬等試験法の概要. Yakugaku Zasshi. 2025;145(2):101-104.

2. 学会発表

1. 佐々野僚一、穂山浩、関澤純平、原野幹久、勝本叶香、斎藤勲、田口貴章、堤智昭、伊藤里恵、岩崎雄介：オンライン固相誘導体化-LC-MS/MS による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分析法の開発. 日本食品化学学会 第 30 回学術大会 (2024 年 5 月 24 日)
2. 勝本叶香、佐々野僚一、島三記絵、原野幹久、野村昂聖、藤田優麻、岩崎雄介、伊藤里恵、田口貴章、堤智昭、穂山浩：LC-MS/MS を用いたほうれんそう中ネオニコチノイド系農薬とその代謝物の一斉分析法の開発. 日本食

品衛生学会 第 120 回学術講演会 (2024 年 11 月 7 日)

3. 曳埜忍、島田京佳、矢島智成、飯島和昭、田口貴章、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ほうれんそうを用いた調査～. 第 41 回農薬環境科学・第 47 回農薬残留分析合同研究会, (2024 年 11 月 11 日)
4. 志田 (齊藤) 静夏：残留農薬等分析における試料調製と抽出について. 令和 6 年度食品衛生登録検査機関協会 残留農薬等研修会 (2025 年 1 月 31 日)
5. 野村昂聖、勝本叶香、原野幹久、藤田優麻、佐々野僚一、岩崎雄介、伊藤里恵、田口貴章、堤智昭、穂山浩：LC-MS/MS を用いたトウモロコシ中グリホサートおよびグルホシネートとその代謝物の一斉分析法の開発. 日本薬学会 第 145 年会 (2025 年 3 月 27 日)
6. 藤田優麻、野村昂聖、勝本叶香、原野幹久、佐々野僚一、島三記絵、岩崎雄介、伊藤里恵、田口貴章、堤智昭、穂山浩：LC-MS/MS を用いたいちご中ネオニコチノイドとその代謝物の一斉分析法の開発. 日本薬学会 第 145 年会 (2025 年 3 月 27 日)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし