

令和4-5年度 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6年度 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
総合研究報告書

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。「[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」では、農薬を散布して栽培した農産物（トマト、ホウレンソウ、ブロッコリー）を用いて試料の均質性が分析結果に与える影響を検討した。均質化の程度が不十分で粗大な固形物を多く含む粗粉碎試料と、固形物が微細になるまで十分に均質化した微粉碎試料を調製し、分析値を比較した結果、粗粉碎試料では分析値が相対的に低くなった。分析値の変動は、ホウレンソウ<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。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。加えて、いずれの作物においても、均質化状態の評価方法として「目開き1mmの篩に負荷した際の通過率」を指標とする手法を提案し、「通過率90%以上」を十分微細に均質化された試料の目安と位置付けた。

また、「[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」では、畜水産物を対象に凍結粉碎による試料調製法を確立した。うなぎ等の一部の水産物では、凍結粉碎法で試料調製を行っても、皮や骨の均質化が不十分となる課題も認められたが、多くの食品では常温磨砕法よりも試料粒子が細くなる傾向が見られた。加えて、牛及び豚の肝臓を用いた検討から、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した。

1 年目は「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I（農産物）」の精製方法を改良することにより、簡便な一斉分析法を検討した。本分析法で添加回収試験を行った結果、玄米、りんご及びキャベツでは検討農薬の 9 割以上で目標値を満たし、食品によっては改良法の方が通知一斉試験法よりも適用できる農薬が多いことが示された。

2 年目は「GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）」の精製方法のみを改良することにより、簡便・迅速な一斉分析法を検討した。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選択性、真度及び精度の目標値を満たした。

3 年目は「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た。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、8 割以上の化合物において妥当性評価ガイドラインの選択性、真度及び精度の目標値を満たした。

確立した分析法はいずれも、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、通知一斉試験法と比べ、精製に用いる試薬や溶媒の使用量を大幅に削減でき、さらに自動化によって、分析担当者の熟練度に起因するばらつきを抑制し、操作時間の短縮と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

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。

1 年目は、誘導体化を行わずに逆相カラムと陰イオンカラムの混合モードカラムを用いて、蜂蜜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) を開発した。開発した方法にて、グリホサートと Gly-A を 25 µg/kg、グルホシネートと MPPA と Glu-A を 5 µg/kg 添加した蜂蜜試料を用いて妥当性評価を行った結果、良好な回収率 (86-106%) と精度 (<10%) を示した。開発したメソッドの定量限界は、グリホサートで 5 µg/kg、Gly-A で 2µg/kg、グルホシネート、MPPA、Glu-A は 1 µg/kg となった。

2 年目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、大豆中のグリホサート、グルホシネート、Gly-A、MPPA、Glu-A を同時定量する LC-MS/MS を開発した。基準値レベルの妥当性評価を行った結果、回収率は 97-108%、併行精度は 2-5%、室内再現精度 4-9%となりガイドラインの目標値 (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。

3 年目は、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 18 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、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。

本研究における研究体制

- ・ 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]
- ・ 根本了（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]
- ・ 神田真軌（東京都健康安全研究センター 食品化学部）[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り、検体全体を十分に均質化しなければ、精確な分析値を得ることはできない。また、試料調製中に分解、揮散、吸着等により減少する場合、残留濃度を過小評価するおそれがあるため、試料調製中の減少を抑制する必要がある。本研究では、試料の均質性が分析結果に与える影響及び試料調製方法による試料調製中の農薬等の減少程度の差異について調査し、適切な試料調製方法や試料の均質性の指標を提案することを目的とし、以下の2つの検討を行った。

[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

[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

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

我が国では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）」や「GC/MSによる

農薬等の一斉試験法（農産物）」等が公示されている。これらの一斉試験法はホモジナイズ抽出後、ミニカラム等を用いて精製する方法であり、精製度が比較的高いため、夾雑成分の影響を受けにくく、測定装置への負担も少ない。その一方、溶媒や試薬の使用量が多く、操作時間も長い。そのため、試験法の簡便化・迅速化が望まれている。

海外では QuEChERS 法と呼ばれる一斉分析法が残留農薬等検査で汎用されている。本分析法は振とう抽出後、固相分散法で精製する方法であり、我が国の通知一斉試験法と比べ操作時間が短く、簡便である。しかしその反面、精製が不十分であり、夾雑成分の影響を受けやすく、装置への負担も大きい。加えて、試料に対する抽出溶媒量が少なく、且つ、振とう抽出であるため、脂質の多い食品中の低極性農薬など、食品と農薬等の組み合わせによっては通知一斉試験法と比べて抽出効率が低いことが指摘されている。このため、通知一斉試験法と QuEChERS 法では分析値に差異が生じる恐れがある。

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。1 年目は通知一斉試験法「LC/MS による農薬等の一斉試験法Ⅰ（農産物）」、2 年目は「GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）」、3 年目は「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、高極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る方法を用いて抽出・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、A. 研究目的に示した 3 つの課題について、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。

班会議の開催状況は以下の通り。

- ・令和 4 年 9 月 7 日（金）（オンライン）
- ・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）
- ・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

各研究課題の方法の概要をは以下に示すが、詳細については各研究課題の（総合）分担研究報告書を参照されたい。

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

試料の均質性の指標を得ることを目的に、管理された圃場で農薬を散布して栽培したトマト、ハウレンソウ、ブロッコリーを用いて試料の均質化状態が分析結果に与える影響を検討した。分析値の変動及び秤取量と分析値の変動についても検証した。加えて、均質化した試料の試料調製用篩の通過率についても検討した。

[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砕法の有用性の検証

畜水産物（牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、豚の筋肉、豚の脂肪、鶏の筋肉、あゆ、えび、うなぎ及びさけ）を対象に、凍結粉砕による試料調製法を確立した。

凍結粉砕法による試料調製中の農薬等の減少抑制効果を検証するため、検体に農薬を添加し、常温磨砕法及び凍結粉砕法で試料調製を行って回収率を比較した。

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

本課題では残留農薬等検査において使用頻度が高い通知一斉試験法の精製操作について、簡便化を図るとともに、確立した方法の自動化を検討した。

1年目は、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）」の精製操作を改良し、簡便化・迅速化した。通知一斉試験法の抽

出方法で得られた抽出液の一部をそのまま ODS ミニカラム（50 mg）及び PSA ミニカラム（30 mg）を連結したカラムで精製し、LC-MS/MS で測定する方法を確立した。

2年目は、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、簡便化・迅速化した。一連の精製操作は自動前処理装置を用いて行った。

3年目は、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、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。

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年目は誘導体化を行わずに逆相カラムと陰イオンカラムの混合モードカラムを用いて、蜂蜜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 Gly-A、MPPA、Glu-A を同時定量する LC-MS/MS 法を開発・検討を行った。

2年目は *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。

3年目は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。

C. 研究結果と考察

本研究によって得られた成果を以下に示す。詳細については各研究課題の（総合）分担研究報告書を参照されたい。

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

管理された圃場で農薬を散布して栽培したトマト、ハウレンソウ、ブロッコリーを用いて試料の均質化状態が分析結果に与える影響を検討した。その結果、均質化が不十分で粗大な固形物を多く含む試料では分析値が相対的に低くなった。特にマラチオンでは、粗粉碎試料の方が微粉碎試料と比較して顕著に低くなった。この傾向は、いずれの作物においても見られたことから、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。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、残留濃度の過小評価リスクを招くことが示唆された。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。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。加えて、いずれの作物においても微細に均質化した試料の約 90%が目開き 1 mm の篩を通過することが確認されたことから、均質化状態の客観的な評価方法として「目開き 1 mm の篩に負荷した際の通過率」を指標とする手法を提案し、「通過率 90%以上」を十分微細に均質化された試料の目安と位置付けた。

[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

畜水産物を対象に、凍結粉碎による試料調製法を確立した。凍結粉碎法の方が、常温磨砕法よりも試料粒子が細くなる傾向が見られた。ただし、うなぎ等の一部の魚種では、凍結粉碎法で試料調製を行っても皮や骨の均質化が不十分となる課題も認められた。

凍結粉碎法による試料調製中の農薬等の減少抑制効果を検証するため、検体に農薬を添加し、

常温磨砕法及び凍結粉碎法で試料調製を行って回収率を比較した。その結果、牛及び豚の肝臓では、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

本課題では残留農薬等検査において使用頻度が高い通知一斉試験法の精製操作について、簡便化を図るとともに、確立した方法の自動化を検討した。

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）」の精製操作を改良し、簡便化・迅速化した。確立した方法は通知一斉試験法の抽出方法で得られた抽出液の一部をそのまま ODS ミニカラム（50 mg）及び PSA ミニカラム（30 mg）を連結したカラムで精製し、LC-MS/MS で測定する方法である。確立した精製方法は、通知一斉試験法で採用されている塩析や濃縮操作を省略し、ミニカラムの充填剤量を約 1/20 にした。これにより、操作時間が大幅に短

縮しただけではなく、溶媒・試薬の使用量や分析にかかるコストを削減することができた。

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可能となった。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ァ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。

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、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。

開発した分析法は、通知一斉試験法と抽出条件が同一であり、抽出効率に起因する分析値の差異は生じないため、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

1 年目は誘導体化を行わずに逆相カラムと陰イオンカラムの混合モードカラムを用いて、蜂蜜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 Gly-A、MPPA、Glu-A を同時定量する LC-MS/MS 法を開発・検討を行った。開発した方法にて、グリホサートと Gly-A を 25 µg/kg、グルホシネートと MPPA と Glu-A を 5 µg/kg 添加した蜂蜜試料を用いて妥当性評価を行った結果、良好な回収率（86-106%）と精度（<10%）を示した。開発したメソッドの定量限界は、グリホサートで 5 µg/kg、Gly-A で 2µg/kg、グルホシネート、MPPA、Glu-A は 1 µg/kg となった。

2 年目は *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。基準値レベルの妥当性評価を行った結果、回収率は 97-108%、併行精度は 2-5%、室内再現精度 4-9% となりガイドラインの目標値（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。オンライン化も検討し妥当性が確認された。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。

3 年目は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、フルピラジフロン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。今後オンライン化を検討する予定である。

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農産物（トマト、ハウレンソウ、ブロッコリー）を用いて試料の均質性が分析結果に与える影響を検討した。均質化の程度が不十分で粗大な固形物を多く含む粗粉碎試料と、固形物が微細になるまで十分に均質化した微粉碎試料を調製し、分析値を比較した結果、粗粉碎試料では分析値が相対的に低くなった。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。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。加えて、いずれの作物においても、均質化状態の評価方法として「目開き 1 mm の篩に負荷した際の通過率」を指標とする手法を提案し、「通過率 90% 以上」を十分微細に均質化された試料の目安と位置付けた。

[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

畜水産物を対象に、凍結粉碎による試料調製法を確立した。凍結粉碎の方が、常温磨砕法よりも試料粒子が細くなる傾向が見られた。

ただし、うなぎ等の一部の魚種では、凍結粉碎法で試料調製を行っても皮や骨の均質化が不十分となる課題も認められた。

凍結粉碎法による試料調製中の農薬等の減少抑制効果を検証するため、検体に農薬を添加し、常温磨砕法及び凍結粉碎法で試料調製を行って回収率を比較した。その結果、牛及び豚の肝臓では、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

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した。

1 年目は「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I（農産物）」の精製方法を改良することにより、簡便な一斉分析法を検討した。本分析法で添加回収試験を行った結果、玄米、りんご及びキャ

ベツでは検討農薬の 9 割以上で目標値を満たし、食品によっては改良法の方が通知一斉試験法よりも適用できる農薬が多いことが示された。

2 年目は「GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）」の精製方法のみを改良することにより、簡便・迅速な一斉分析法を検討した。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選択性、真度及び精度の目標値を満たした。

3 年目は「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た。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、8 割以上の化合物において妥当性評価ガイドラインの選択性、真度及び精度の目標値を満たした。

確立した分析法はいずれも、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、通知一斉試験法と比べ、精製に用いる試薬や溶媒の使用量を大幅に削減でき、さらに自動化によって、分析担当者の熟練度に起因するばらつきを抑制し、操作時間の短縮と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

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。

1 年目は、誘導体化を行わずに逆相カラムと陰イオンカラムの混合モードカラムを用いて、蜂蜜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) を開発した。開発した方法にて、グリホサートと Gly-A を 25 µg/kg、グルホシネートと MPPA と Glu-A を 5 µg/kg 添加した蜂蜜試料を用いて妥当性評価を行った結果、良好な回収率 (86-106%) と精度 (<10%) を示した。開発したメソッドの定量限界は、グリホサートで 5 µg/kg、Gly-A で 2µg/kg、グルホシネート、MPPA、Glu-A は 1 µg/kg となった。

2 年目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、大豆中のグリホサート、グルホシネート、Gly-A、MPPA、Glu-A を同時定量する LC-MS/MS を開発した。基準値レベルの妥当性評価を行った結果、回収率は 97-108%、併行精度は 2-5%、室内再現精度 4-9%となりガイドラインの目標値（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。

3 年目は、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 18 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、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。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Torii, A., Seki, Y., Arimoto, C., Hojo, N., Iijima, K., Nakamura, K., Ito, R., Yamakawa, H., Akiyama, H., Development of a simple and reliable LC-MS/MS method to simultaneously detect walnut and almond as specified in food allergen labelling regulations in processed foods. *Current Research in Food Science*, 2023; **6**, 100444.
2. 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.*, 2023; **39**, 1023-1031.
3. 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.
4. 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.
5. 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. 志田（齊藤）静夏：残留農薬等分析における試料調製について. 第 59 回全国衛生化学技術協議会年会（2022 年 11 月 1 日）
2. 志田（齊藤）静夏、齋藤真希、根本了、堤智昭：果実における試料調製方法の検討：ドライアイスまたは液体窒素を用いた凍結粉砕法と常温磨砕法の比較. 第 45 回農薬残留分析研究会（2022 年 11 月 24 日）

3. 佐々野 遼一、伊藤 里恵、楠本真宏、関澤 純平、亀山 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）
4. 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）
5. Hiroshi Akiyama、Yoshinari Suzuki、Tomoaki Tsutsumi: International Conference on Food Safety and 38th KoSFos Annual Meeting.（2023 年 11 月 30 日）
6. 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）
7. 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）
8. 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、亀山 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）
9. 佐々野僚一、亀山浩、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）
10. 勝本叶香、佐々野僚一、島三記絵、原野幹久、野村昴聖、藤田優麻、岩崎雄介、伊藤里恵、田口貴章、堤智昭、亀山浩：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)

11. 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ハウレンソウを用いた調査～. 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)
12. 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)
13. 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)

14. 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

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし