

食品と医薬品等に含まれる有害化学物質等の分析技術の開発に関する研究

—水産物及び穀類等の残留農薬分析法の検討について—

吉岡敏行，難波順子，浅田幸男，赤木正章，北村雅美（衛生化学科）

【調査研究】

食品と医薬品等に含まれる有害化学物質等の分析技術の開発に関する研究

－水産物及び穀類等の残留農薬分析法の検討について－

Study on the development of analytical techniques of hazardous chemicals
contained in food and pharmaceuticals, etc.

－Study of pesticide residue analytical method in marine products and cereals, etc－

吉岡敏行, 難波順子, 浅田幸男, 赤木正章, 北村雅美 (衛生化学科)

Toshiyuki Yoshioka, Junko Namba, Yukio Asada, Masaaki Akaki, Masami Kitamura
(Food and Drug Chemical Research Section)

要 旨

水産物及び穀類等の残留農薬分析法について、通知法を改良した精製法を検討した結果、多機能カラムを採用することにより、脂肪酸エステル類やコレステロール類等の妨害成分を効率的に除去できることが判明した。マトリックス標準液を用いて定量した結果、農薬136～216成分について良好な回収率が得られた。

[キーワード：残留農薬, 食品, 精製, ガスクロマトグラフ質量分析計]

[Key words : Pesticide residue, Food, Purification, GC-MS]

1 はじめに

本県では、野菜及び果実類について「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法」(平成17年1月24日付け食安発第0124001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知、以下「通知法」という)の「GC/MSによる農薬等の一斉試験法(農産物)」に準じた方法を用いて、厚生労働省の妥当性評価ガイドラインに従った妥当性評価試験を実施し、ガイドラインの目標値を満たした検査項目について除去検査を実施している。今回、除去検査可能な品目を増やすために、水産物及び穀類等の一斉分析法を検討した。魚試料について、通知法の「GC/MSによる農薬等の一斉試験法(畜水産物)」に従い、アセトン及びヘキサン混液で抽出後、ゲル浸透クロマトグラフ(GPC)処理とエチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム(PSA)処理を行い、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)を用いて測定を行ったところ、脂肪酸エステル類やコレステロール類の除去が不十分で、分析装置の汚染の原因となるほか回収率が異常となる農薬もあった。そのため、GPCやPSAに替わる精製法として、シリカゲルカラムや多機能カラム、グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムによる方法について検討し、若干の知見が得られたので報告する。

2 材料及び方法

2.1 試料

水産物(ボラ, アナゴ, カキ, サーモン)は、可食部をホモジナイズした後、冷凍保存したペースト状のものを解凍して使用した。穀類・豆類・種実類(玄米, 大豆, なたね)は、ミルサーで粉末にしたものを使用した。

2.2 標準品及び固相カラム

混合標準液①: PL2005 農薬 GC/MS Mix I～VII: 林純薬(354成分)を混合した。

混合標準液②: PL-1-1～PL-12-1等: 和光純薬(269成分: 既報のとおり¹⁾)を混合した。

エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム:
BOND ELUT JR-PSA 500mg VARIAN

シリカゲルカートリッジカラム: Supelclean LC-Si 1g/6mL SUPELCO
グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム:

ENVI-Carb/LC-NH₂ 500mg:500mg/6mL SUPELCO
オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム: MEGA BE-C18 1g/6mL VARIAN
多機能カラム: MultiSep PR Romer Labs

2.3 装置

GPC: Shodex CLNpak EV-G (20mm × 100mm) +EV-2000 (20mm × 300mm)

移動相アセトン: シクロヘキサン (1:4), カラム温度 40℃
流速 4mL/min, 注入量 2mL

GC-MS : JMS-Q1000GC

GC カラム : GLScience InertCap 5MS/NP
30m+10m 0.25mm × 0.25 μ m

Varian-240MS

GC カラム : Agilent DB-5MS 30m+DG10m
0.25mm × 0.25 μ m

Varian-300MS

GC カラム : Agilent VF-5MS30m+EZ Guard
10m 0.25mm × 0.25 μ m

各 GC-MS の操作条件は、既報^{1),2)}のとおり行った。

2.4 前処理方法

最初に、水産物について検討した分析フローを図1に示す。通知法どおりに前処理したものを試験溶液①、通知法にLC-Siを追加したものを試験溶液②とした。GPCを省略し、代わりにENVI-Carb/LC-NH₂処理したものを試験溶液③、同様に、C18+ENVI-Carb/LC-NH₂処理したものを試験溶液④とした。次に、穀類等と水産物について検討し

た分析フローを図2に示す。それぞれ、抽出後、MultiSep PR+ENVI-Carb/LC-NH₂ (連結カラム) で処理したものを試験溶液⑤とした。

各精製処理は、次のとおり行った。PSAは、アセトン：ヘキサン (1：1) 10mL でコンディショニングし、抽出液を負荷した後、同溶媒 20mL で溶出した。LC-Siは、ヘキサン 10mL でコンディショニングし、抽出液を負荷した後、第1 溶出画分 (Fr1) としてヘキサン 5mL, Fr2 としてエーテル：ヘキサン (1：9) 5mL, Fr3 としてアセトン：ヘキサン (5：95) 5mL, Fr4 としてアセトン：ヘキサン (1：9) 5mL, Fr5 としてアセトン：ヘキサン (1：4) 5mL, Fr6 としてアセトン 5mL で順次溶出し、6 分画液を得た。ENVI-Carb/LC-NH₂ は、トルエン：アセトニトリル (1：3) 10mL でコンディショニングし、抽出液を負荷した後、同溶媒 20mL で溶出した。C18+ ENVI-Carb/LC-NH₂ は、トルエン：アセトニトリル (1：3) 10mL でコンディショニングし、抽出液を負荷した後、同溶媒 20mL で溶出した。

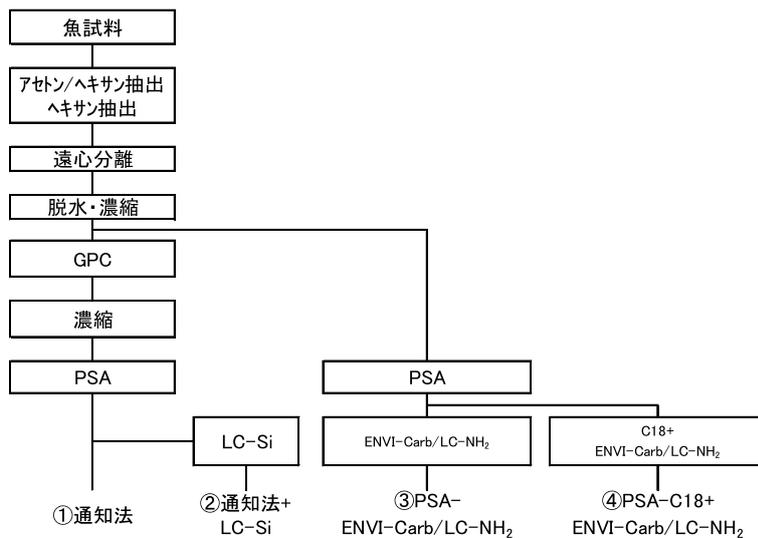


図1 分析フロー

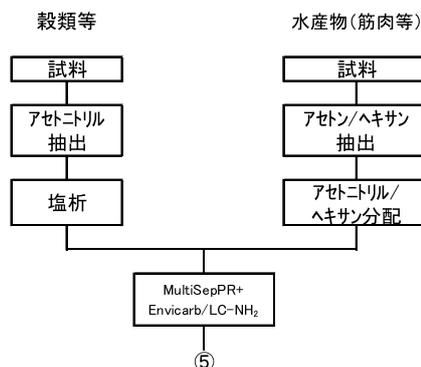


図2 MultiSep PR + ENVI-Carb/LC-NH₂ を用いた分析フロー

GPCは、10分から40分まで2分ごと8mLずつ分画液を得た。MultiSep PR+ENVI-Carb/LC-NH₂は、それぞれアセトニトリル10mLでコンディショニングし、抽出液を負荷後、アセトニトリル9mLで溶出後、MultiSep PRを取り外し、ENVI-Carb/LC-NH₂にトルエン:アセトニトリル(1:3)15mLで溶出し、合計約24mLの溶出液を得た。

3 検討結果及び考察

3.1 GPCの分画状況

通知法に基づく条件でGPCを用いて混合標準溶液①の分画試験を行った。14分～40分(56mL～160mL)を2分毎(8mL)に分取したところ、回収率が良好な(70%以上、140%未満)農薬は249成分であった。回収率が70%未満

の農薬は66成分、回収率が140%を超過する農薬は39成分であった。GPC処理は、装置の安定や操作性の点から1日に処理できる試料が10検体程度(40分/1試料)である。操作を自動化できるメリットはあったが、8時間稼働で移動相が1.92Lと使用する溶媒が多いデメリットがあった。通知法のGPC画分の指標農薬として示されたアクリナトリンは14～16分(56～64mL)に溶出し、トリシクラゾールは24～26分(96～104mL)に溶出した。アクリナトリンと同じ画分に溶出するのは、テフルトリンやフェンプロピモルフ等10成分であった。しかし、魚試料ではこの画分には脂肪酸エステル類が同時に溶出し、測定を妨害するとともに装置が著しく汚染される懸念があったため、分取しなかった。トリシクラゾールより後の画分に溶

表1 処理法別の添加回収試験結果(農薬数)

回収率	①GPC-PSA (通知法)	②GPC-PSA (LC-Si追加)	③PSA-ENVI- Carb/LC-NH ₂	④PSA-C18+ Envicarb/LC-NH ₂
<70%	33	101	28	15
70～140%	83	217	313	268
>140%	238	36	13	71

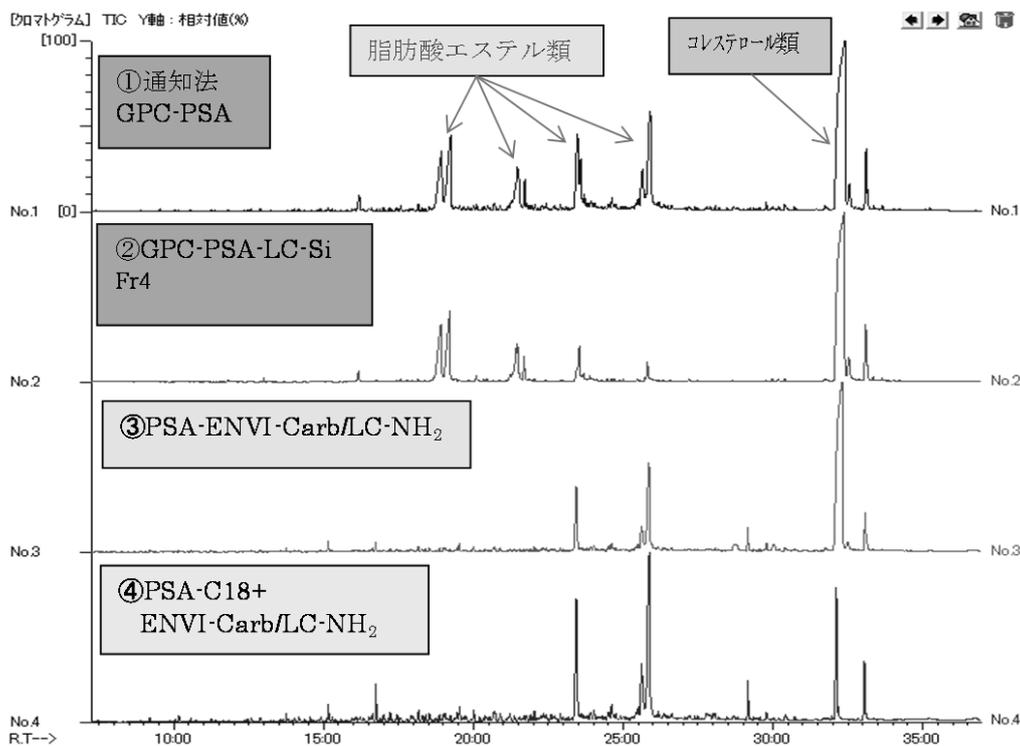


図3 クロマトグラフ(処理法①～④)

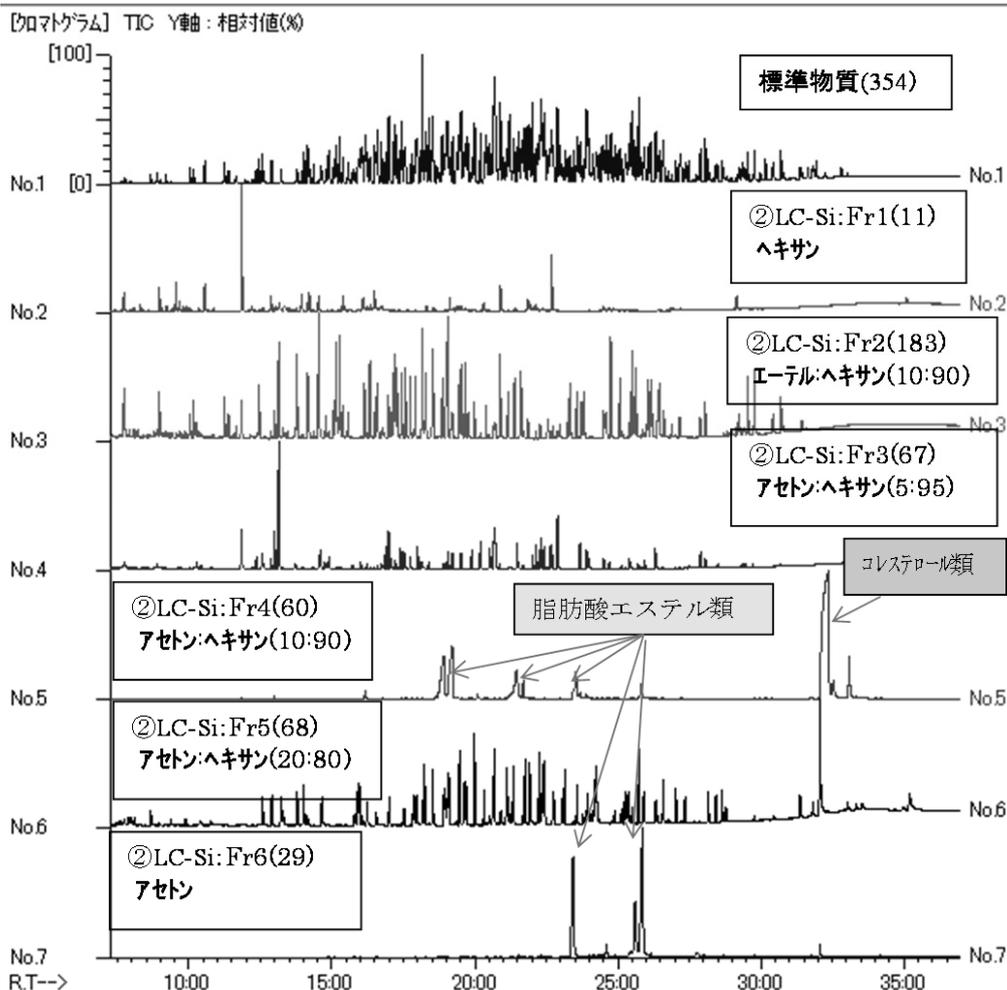


図4 クロマトグラフ (② LC-Si の分画別 : JMS-Q1000GC-SCAN)

出するものは、サリチオンやオキサジキシル、クロロネブ等 25 成分であり、この画分にはほとんど妨害成分は認められなかった。なお、32～40 分には農薬はほとんど溶出しなかった。したがって、GPC 処理は、16～32 分 (64～128mL : 64mL) を分取することとした。

3.2 通知法及びその改良法の添加回収試験結果

ボラ試料 20g (脂肪含有量約 3%) に混合標準溶液①を各農薬 1 μg (50ng/g-wet) となるよう添加し、図 1 の分析フローのとおり操作し、JMS-Q1000GC を用いて SCAN 測定した。添加回収試験結果を表 1 に示す。また、測定溶液のクロマトグラムを図 3 と図 4 に示す。

① GPC-PSA (通知法) は、脂肪酸エステル類やコレステロール類が多量に残存しており、精製不足で回収率が 140% を超過した農薬は 238 成分と多く、良好な回収率を示した農薬は 83 成分だけであった。② GPC-PSA (LC-Si 追加) は、良好な回収率が得られた農薬は 217 成分と増加したが、回収率が 70% 未満の農薬も 101 成分に増加した。また、LC-Si は 6 分画する煩雑な操作と Fr4 に脂肪酸

エステル類とコレステロール類が、Fr6 に脂肪酸エステル類が溶出してくる欠点があった。③ PSA-ENVI-Carb/LC-NH₂ は、コレステロール類の除去は不十分であったが、比較的 low molecular weight の脂肪酸はかなり除去でき、回収率が良好な農薬は 313 成分と飛躍的に増加した。④ PSA-C18+ENVI-Carb/LC-NH₂ は、クリーンアップ効果は最も高く、回収率が良好な農薬は 268 成分であったが、操作が煩雑であるデメリットが大きかった。また、回収率が 140% を超過する農薬が 71 成分と増加した。通知法を基に 4 種類の前処理方法を検討したが、十分満足できる方法が見つからなかった。そこで、さらに MultiSep PR 処理を組み込んだ前処理方法について検討を行った。

3.3 MultiSep PR の分画状況

MultiSep PR は、魚介類や畜産物試料の前処理方法として採用^{3),4)}されており、脂肪酸エステル類の除去効果が高いことがわかっている。氏家ら³⁾は、MultiSep PR の溶出溶媒について検討した結果、アセトン/ヘキサン系では脂肪酸エステルが保持されず、酢酸エチル、アセトニトリ

表2 MultiSep PR の回収率

回収率	0%	<70%	70~120%	>120%	計
農薬数	26	38	180	25	269

表3 穀類等の高濃度添加回収試験結果（農薬数）

回収率	40~70%	70~120%	>120%	計
操作ブランク	24	144	119	287
大豆	16	80	179	275
玄米	10	56	216	282
なたね	16	93	172	281

ル、トルエン:アセトニトリル (1:3) では、トリアジン系、トリゾール系などの有機窒素系 27 農薬や有機リン系 10 農薬で回収率が悪く、メタノール溶出でこれら農薬の回収率が向上することが認められたと報告している。しかし、標準物質を用いた分画試験を行ったところ、メタノールを流すと不溶性の白い懸濁物質が溶出してくることが判明したことから、メタノール溶出は採用せず、アセトニトリル溶出だけとした。

MultiSep PR にアセトニトリル 10mL を流してコンディショニングし、混合標準液②を負荷し、アセトニトリルを用いて 9mL 流したときの回収率を表2に示す。良好な回収率を示した農薬は 180 成分、回収率が 70% を下回るものが 38 成分、カラムに吸着して全く回収できないものが 26 成分であった。

3.4 MultiSep PR + ENVI-Carb/LC-NH₂ (連結カラム) で処理する方法の検討

通知法の「GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）」による穀類、豆類及び種実類のクリーンアップは、まず C18 で精製、溶出した後、濃縮した溶出液を ENVI-Carb/LC-NH₂ で処理する方法であるが、C18 の代わりに MultiSep PR を用いるとともに ENVI-Carb/LC-NH₂ との連結カラム処理法を採用し、前処理の効率化を図った。また、畜水産物の筋肉・脂肪・魚介類・乳及び卵の場合の前処理法は、アセトン/ヘキサン抽出後、GPC-PSA 処理であるが、アセトニトリル/ヘキサン分配 - MultiSep PR + ENVI-Carb/LC-NH₂ について検討した。

高濃度添加回収試験として、玄米、大豆、なたね各 20g を抽出し、8g 相当を分取し、混合標準溶液①を各農薬が 1 μg (125ng/g) となるよう添加し、図2に示す分析フローのとおり処理し、Varian-240MS を用いて SCAN 測定した。回収率を表3に、クロマトグラムを図5に示す。いずれの試料にも、妨害成分はほとんど観察されず、MultiSep PR のクリーンアップ効果を確認できた。しかし、回収率が 120% を超過する農薬が多く、正のマトリックス効果が

認められ、マトリックス検量線による定量法を検討する必要があると考えられた。

低濃度添加回収試験として、玄米、大豆、なたね各抽出液 (4g 相当) 及びアナゴ、カキ、サーモン各抽出液 (4g 相当) それぞれに、混合標準液①を各農薬が 40ng (10ng/g) となるように添加し、図2に示す分析フローのとおり処理し、Varian-300MS を用いて MS/MS 測定した。添加回収結果を表4に示す。回収率が 120% を超過する農薬が多かった

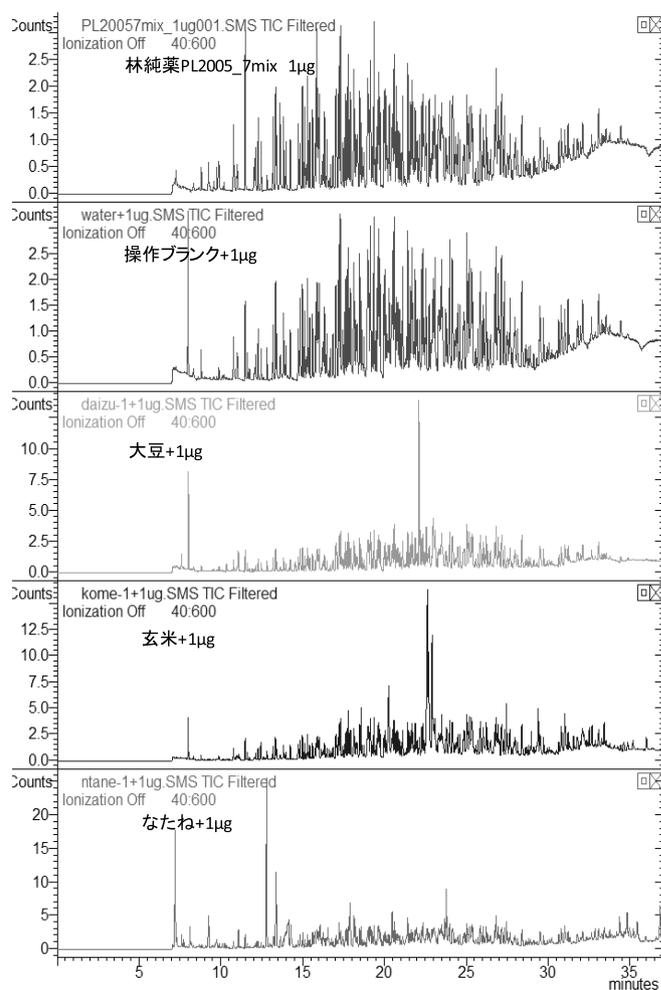


図5 クロマトグラム (高濃度添加回収試験: Varian-240MS-SCAN)

表4 低濃度添加回収試験結果（農薬数）

回収率	40～70%	70～120%	120～200%	計
アナゴ	10	145	58	213
カキ	9	123	71	203
サーモン	3	104	53	160
玄米	33	146	28	207
大豆	17	147	56	220
なたね	11	143	50	204

表5 低濃度添加回収試験結果
（マトリックス検量線で定量）（農薬数）

回収率	40～70%	70～120%	120～200%	計
アナゴ	12	201	1	214
カキ	17	185	1	203
サーモン	12	197	2	211
玄米	56	136	2	194
大豆	19	194	1	214
なたね	3	216	4	223

ため、マトリックス標準液を用いることを検討した。マトリックス標準液で定量した添加回収結果を表5に示す。回収率が120%を超過する農薬はほとんどなくなり、良好な回収率の農薬は最大で216成分となった。

低濃度添加回収試験試料を Varian-240MS を用いて SCAN 測定したクロマトグラムを図6に示す。アナゴと玄米は非常にきれいになっていた。カキは黄色の着色成分が MultiSep PR から溶出しており、脂肪酸エステル類等が残存していることが観察された。サーモンはアセトニトリル / ヘキサン分配においてエマルジョンが生成し、油脂類が十分除去しきれっていない可能性があった。大豆はリノール酸メチル等が残っていた。なたねも若干、精製不足気味であるが、野菜類・果実類の一斉分析法の試料と同程度のクリーンアップ効果が得られていると考えられた。

以上の検討結果から、穀類及び水産物（筋肉等）は、クリー

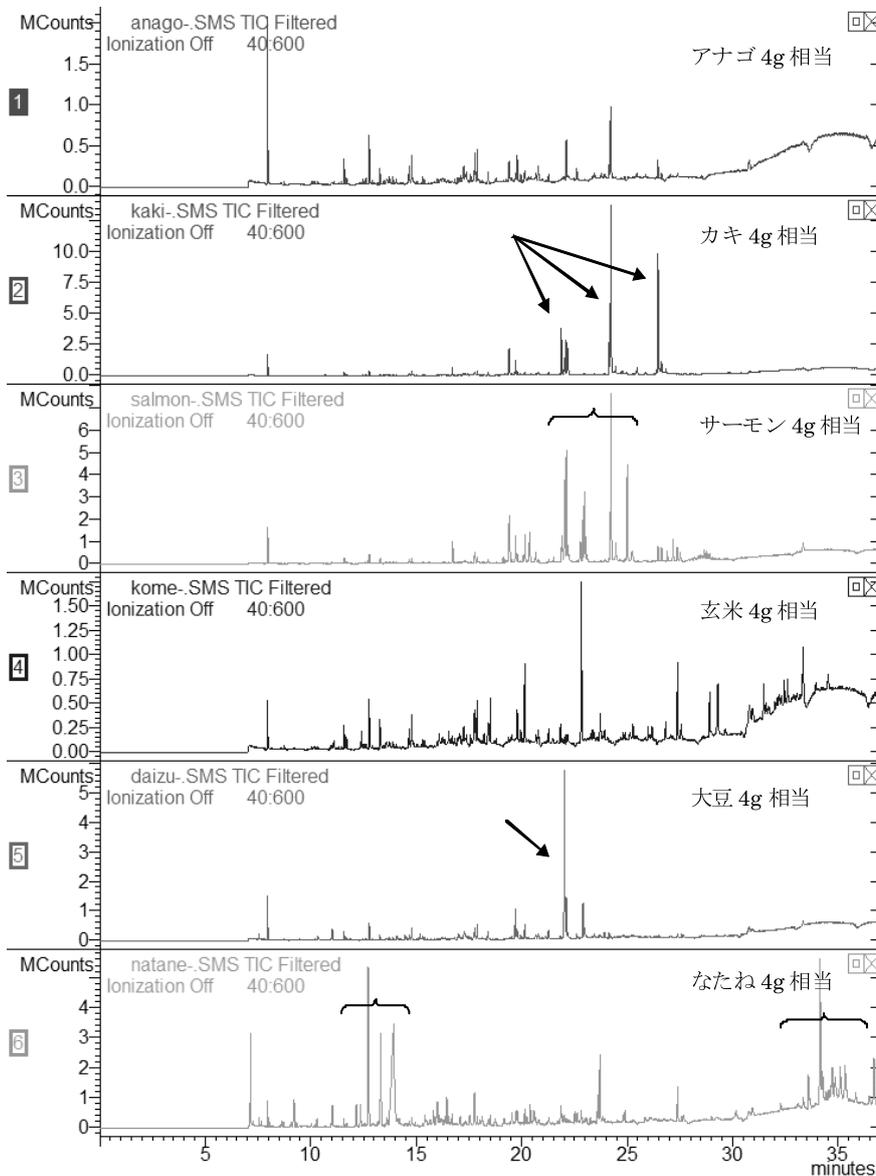


図6 クロマトグラム（低濃度添加回収試験：Varian-240MS-SCAN）

ンアップに連結カラムを実施することにより妨害成分を十分除去できることが判明した。今後は、図2の分析フローに基づいて、水産物及び穀類・豆類・種実類の妥当性評価試験を実施する予定である。また、今回は、GC/MS対象農薬について検討を実施したが、LC/MS対象農薬についても同様に、妥当性評価試験を実施する予定である。

3 まとめ

水産物及び穀類・豆類・種実類中の残留農薬一斉分析法について、MultiSep PRとENVI-Carb/LC-NH₂の連結カラム処理を用いた前処理法を検討し、操作が比較的簡単で、クリーンアップ効果の高い分析法を構築した。

- ① 通知法に基づいてボラ試料を検査したところ、脂肪酸エステル類やコレステロール類が多量に残存し、精製が不十分であることが判明した。
- ② MultiSep PRを用いて農薬269成分をアセトニトリルで溶出したところ、180成分が良好な回収率であった。
- ③ MultiSep PRとENVI-Carb/LC-NH₂のタンデム処理により、脂肪酸エステル類やコレステロール類は十分除去されたが、正のマトリックス効果が観察されたことから、マトリックス標準液での定量を実施したところ、改善が見られた。
- ④ 今回、検討した分析フローに基づいて、畜水産物及び穀類・豆類・種実類中の残留農薬分析法の妥当性評価試験を順次、実施する計画である。

文 献

- 1) 難波順子, 浅田幸男, 赤木正章, 北村雅美, 肥塚加奈江: GC/MS/MSを用いた野菜類及び果実類中残留農薬の一斉分析法の妥当性評価(第1報), 岡山県環境保健センター年報, 38, 69-81, 2014
- 2) 吉岡敏行, 山辺真一, 坂口浩範, 大月史彦: 有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究 - GC/MSを用いた水質中フタル酸エステル(PAE)の多成分分析法の検討 -, 岡山県環境保健センター年報, 36, 35-43, 2012
- 3) 氏家愛子, 千葉美子, 大熊紀子, 吉田直人, 濱名 徹: GC/MS/MS及びLC/MS/MSによる魚介類の残留農薬一斉分析, 宮城県環境保健センター年報, 28, 45-48, 2010
- 4) 近藤貴英, 燕木康郎, 柴田雅久, 黒川千恵子, 井上 豊, 山本善彦, 宮崎元伸: 分散固相抽出および多機能カラムを用いたGC-MS/MSによる畜水産物中の残留農薬一斉分析法, 食衛誌, 53(2), 75-84, 2012