

食品に残留する農薬等の試験法の開発について

新潟県保健環境科学研究所 生活衛生科
饒村 健一

食品に残留する農薬等の成分である物質の試験法 開発・検証業務

- 目的：食品中に残留する農薬等について、一定の量を超えて農薬等が残留する食品の販売等を原則禁止するポジティブリスト制度が、平成18年5月に施行

→残留基準が設定されている農薬等、国内外において検出事例のある農薬等及び新たに残留基準が設定される農薬等について試験法を整備する必要がある

厚労省は、日頃から残留農薬の検査を実施し専門技術を有する衛生研究所等に試験法の開発・検証業務を委託している

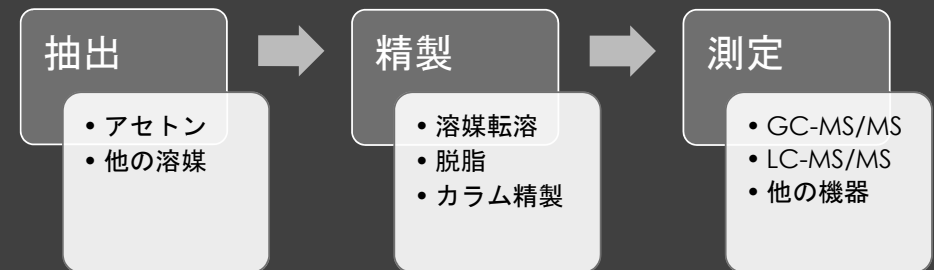
2

残留農薬等試験法開発実施要領

- 試験法開発の基本ルールを規定
- 農産物の場合、「アセトン抽出→溶媒転溶→(脱脂)→精製→測定」が基本だが、「なぜ、その操作を採用したか」が明確であれば、自由に変更可
- 畜水産物で、脂肪を溶解しない溶媒(アセトニトリルなど)を抽出溶媒に用いる場合、融解脂肪に農薬等を添加し、再凝固させた状態からの抽出状況の評価する必要あり
- 添加回収試験は、「定量限界濃度」及び「基準値濃度」の2濃度。定量限界は、基準値濃度の1/10を目処とし、かつ、0.01 ppm以下であることが望ましい
- 評価基準は妥当性評価ガイドラインとほぼ同じだが、室内精度の確認は要しない

3

試験法開発の検討の進め方



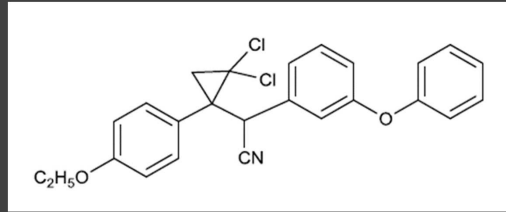
- フローの後ろ側から順に検討
- 文献情報(目的物質の溶解性や極性、既存の試験法等)を参考に、実地で確認を進める
乾固時の残留物、試料液の着色状況(目視)
SCAN測定時の夾雑ピーク
マトリックスStd/溶媒Std 等
- 添加回収試験で性能確認

4

シクロプロトリン試験法検討

シクロプロトリン(Cycloprothrin)

- ・ピレスロイド系殺虫剤
- ・適用農作物：稲、いぐさ
- ・適用害虫：イネミズゾウムシ等
- ・分子量：482.36
- ・水に溶けにくい
- ・生物濃縮を受けやすい
- ・基準値：米（玄米） 0.05 ppm
魚介類 0.4 ppm



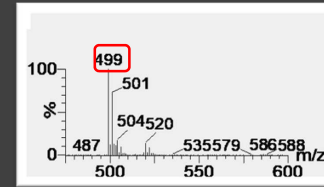
©小濱継雄

国立環境研究所
侵入生物データベースより

→検討対象食品：玄米、しじみ、うなぎ

5

MS測定条件の検討①



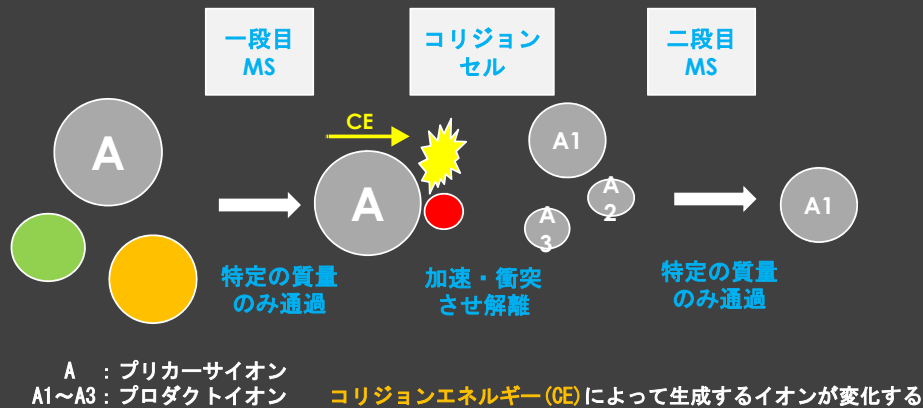
シクロプロトリンのマスペクトル
(ESI(+), コーン電圧30 V)

- ・アンモニウムイオン付加分子[M+NH₄]⁺であるm/z 499.2を良好に検出
→これをプリカーサイオンに選択
- ・コリジョンエネルギーを変化させてプロダクトイオンを確認した



6

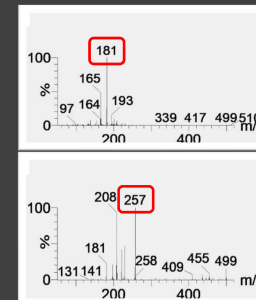
タンデム質量分析(MS/MS)の模式図



7

MS測定条件の検討②

プリカーサイオン(m/z) : 499.2
コリジョンエネルギー(CE) : 上 40 eV / 下 15 eV



- ・イオン強度の高いものから定量イオン、定性イオンを選択
m/z 499.2→180.9(CE 40 eV)を定量用
m/z 499.2→257.1(CE 15 eV)を定性用に設定した



シクロプロトリンのプロダクトイオンスペクトル
(ESI(+), コーン電圧30 V)

8

LC測定条件の検討

- アンモニウムイオン付加分子をターゲットとするため、移動相は酢酸アンモニウムを含む溶媒を使用
- メタノール混液とした場合とアセトニトリル混液とした場合では、メタノール混液のほうが10倍以上高いイオン強度が得られた



LC条件

カラム: ODS (Xterra MS C18)

移動相: A= 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

B= 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液

B; 85%のアイソクラティック条件ではピーク形状が広がるため、

B; 10% (0分)→70% (3分)→90% (13-22分)のグラジエント条件とした

試料溶液調製方法の検討 (抽出)

- 玄米については通知一斉法に準拠し、試料濃縮率を変更することで対応した (通知一斉法に従ったときの4倍濃縮に相当) ※今回は割愛
- うなぎ及びしじみについては、脂肪分を考慮してアセトン抽出とし、抽出操作上問題はなかった
- アセトン抽出液からヘキサンに転溶し、硫酸ナトリウムで水分を除去
ヘキサン転溶
(試料のアセトン抽出液を20 mL分取することを想定)
アセトン20 mL + Std + 10% NaCl 50 mL
1回目ヘキサン50 mL、2回目ヘキサン25 mLで振とう抽出
→ 回収率; 1回目108%、2回目0%

試料溶液調製方法の検討 (精製)

- 脂肪分を除くためヘキサンを留去し乾固後、アセトニトリルに溶解
- アセトニトリル溶液から夾雑物質を除去するため、C18固相ミニカラムによる精製を実施
→C18精製後も夾雑物質が残るため、別種の固相カラムによる追加精製を検討した

試料溶液調製方法の検討

フロー案

試料 10 g

アセトン抽出、100 mL定容、20 mL分取

ヘキサン転溶(10%NaCl 50 mL、ヘキサン50 mL、25 mL抽出)

脱水、濃縮、乾固、アセトニトリル 1 mLに溶解

C18(1 g)精製(アセトニトリル 4 mL溶出)

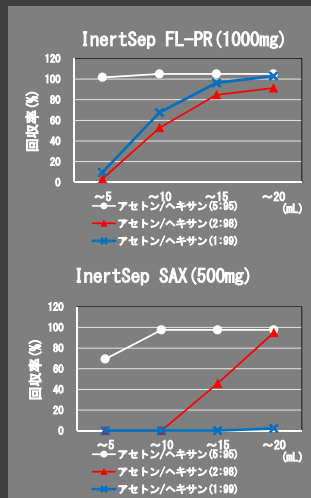
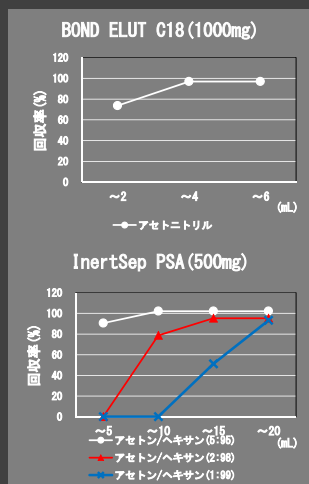
濃縮、乾固、ヘキサン 1 mLに溶解

ミニカラム精製

濃縮、乾固、メタノール1mL定容

試料溶液調製方法の検討

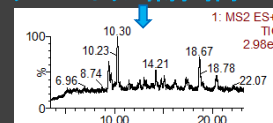
各種固相ミニカラムでのシクロプロトリン溶出パターンの確認



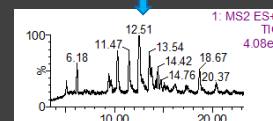
試料溶液調製方法の検討

各種固相ミニカラムの精製効果(しじみ)

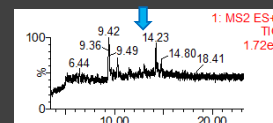
シクロプロトリン保持時間12.9分



InertSep PSA (500 mg)
アセトン・ヘキサン (5:95) 10 mL 溶出
→ マトリクス比 **0.79**



InertSep FL-PR (1000 mg)
アセトン・ヘキサン (5:95) 7 mL 溶出
→ マトリクス比 **0.50**



InertSep PSA (500 mg)
アセトン・ヘキサン (1:99) 5 mL 洗浄
アセトン・ヘキサン (5:95) 10 mL 溶出
→ マトリクス比 **0.93**

※マトリクス(Mt)比=マトリクス添加標準のピーク面積/溶媒標準のピーク面積
1に近いほど、マトリクス中の夾雑成分の影響が少ない

13

14

試料溶液調製方法の検討

フロー案

試料 10 g
アセトン抽出、100 mL定容、20 mL分取

ヘキサン転溶(10%NaCl 50 mL、ヘキサン50 mL、25 mL抽出)
脱水、濃縮、乾固、アセトニトリル 1 mLに溶解

C18(1 g)精製(アセトニトリル 4 mL溶出)
濃縮、乾固、ヘキサン 1 mLに溶解

PSA精製(アセトン・ヘキサン(1:99) 5 mL洗浄、(5:95) 10 mL溶出)
濃縮、乾固、メタノール1mL定容

15

試料溶液調製方法の検討

フロー案の修正

試料 10 g
アセトン抽出、100 mL定容、20 mL分取

ヘキサン転溶(10%NaCl 50 mL、ヘキサン50 mL、25 mL抽出)
脱水、濃縮、乾固、アセトニトリル 1 mLに溶解

C18(1 g)精製(アセトニトリル 4 mL溶出)
濃縮、乾固、ヘキサン 1 mLに溶解

PSA精製(アセトン・ヘキサン(1:99) 5 mL洗浄、(5:95) 10 mL溶出)
濃縮、乾固、メタノール1mL定容

分離が悪いため、
100 mLに変更

油が多いと溶けにくいので、
アセトニトリル/ヘキサン分
配追加

ロットが変わったら夾雑成分を保持できなくなっ
たので、2 gに変更、溶出量も変更

16

試料溶液調製方法の検討

アセトニトリル/ヘキサン分配 (脱脂)

ヘキサン30 mL + Std

ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで3回抽出

→ 回収率 ; 1回目102%、2回目3%、3回目0%
アセトニトリル/ヘキサン分配は2回とした。

17

試料溶液調製方法の検討

修正したフロー案

試料 10 g

アセトン抽出、100 mL定容、20 mL分取

ヘキサン転溶(10%NaCl 100 mL、ヘキサン50 mL、25 mL抽出)
脱水、濃縮、乾固

アセトニトリル/ヘキサン分配
(ヘキサン30mL、ヘキサン飽和アセトニトリル30mL 2回抽出)
濃縮 1 mL以下まで

C18(2 g)精製(アセトニトリル 5 mL溶出)
濃縮、乾固、ヘキサン 1 mLに溶解

PSA精製(アセトン・ヘキサン(1:99) 5 mL洗浄、(5:95) 10 mL溶出)
濃縮、乾固、メタノール1mL定容

添加回収試験結果	回収率	73%
マトリクス比		1.0
ロスの原因は？		

18

試料溶液調製方法の検討

ロスの原因調査 1

試料 10 g

アセトン抽出、100 mL定容、20 mL分取

← ①

ヘキサン転溶(10%NaCl 100 mL、ヘキサン50 mL、25 mL抽出)
脱水、濃縮、乾固

← ②

← ③

アセトニトリル/ヘキサン分配
(ヘキサン30mL、ヘキサン飽和アセトニトリル30mL 2回抽出)
濃縮 1 mL以下まで

← ④

C18(2 g)精製(アセトニトリル 5 mL溶出)
濃縮、乾固
ヘキサン 1 mLに溶解

← ⑤

PSA精製(アセトン・ヘキサン(1:99) 5 mL洗浄、(5:95) 10 mL溶出)
濃縮、乾固
メタノール1mL定容

← ⑥

→ ブランク6本に、それぞれ別の段階で標準液添加

19

試料溶液調製方法の検討

ロスの原因調査 1

試料 10 g

アセトン抽出、100 mL定容、20 mL分取

← ① 73%

ヘキサン転溶(10%NaCl 100 mL、ヘキサン50 mL、25 mL抽出)
脱水、濃縮、乾固

← ② 68%(漏れた)

← ③ 64%(漏れた)

アセトニトリル/ヘキサン分配
(ヘキサン30mL、ヘキサン飽和アセトニトリル30mL 2回抽出)
濃縮 1 mL以下まで

← ④ 79%

C18(2 g)精製(アセトニトリル 5 mL溶出)
濃縮、乾固
ヘキサン 1 mLに溶解

← ⑤ 75%

PSA精製(アセトン・ヘキサン(1:99) 5 mL洗浄、(5:95) 10 mL溶出)
濃縮、乾固
メタノール1mL定容

← ⑥ 98%

→ PSA精製の段階がロスの原因

20

試料溶液調製方法の検討

ロスの原因調査 2

C18(2 g)精製(アセトニトリル 5 mL溶出)、濃縮、乾固後
ヘキサン1mLに溶解、PSAに負荷

- ① 濃縮容器内壁をヘキサンで洗い込み後、
ヘキサン計5 mL洗浄、アセトン・ヘキサン(5:95) 10 mL溶出 **回収率 60%**
- ② 濃縮容器内壁をアセトン・ヘキサン(1:99)で洗い込み後、
アセトン・ヘキサン(1:99) 計5 mL洗浄、(5:95) 10 mL溶出 **回収率 73%**
- ③ 濃縮容器内壁をアセトン・ヘキサン (5:95)で洗い込み、
アセトン・ヘキサン(5:95) 計10 mL溶出(PSA洗浄なし) **回収率 95%**

乾固後内壁に残ったシクロプロトリンは、ヘキサンやアセトン・ヘキサン(1:99)
では溶けにくい？

→ PSA洗浄操作をやめ、アセトン・ヘキサン(5:95)で洗いこみ、溶出

21

試料溶液調製方法の検討

フロー案 最終版

試料 10 g
アセトン抽出、100 mL定容、20 mL分取

↓

ヘキサン転溶(10%NaCl 100 mL、ヘキサン50 mL、25 mL抽出)
脱水、濃縮、乾固

↓

アセトニトリル/ヘキサン分配
(ヘキサン30mL、ヘキサン飽和アセトニトリル30mL 2回抽出)
濃縮 1 mL以下まで

↓

C18(2 g)精製(アセトニトリル 5 mL溶出)
濃縮、乾固、アセトン・ヘキサン(5:95) 1 mLに溶解

↓

PSA精製(アセトン・ヘキサン (5:95) 10 mL溶出)
濃縮、乾固、メタノール1mL定容

22

シクロプロトリン試験法検討

添加回収試験結果

食品名	添加濃度 (mg/kg)	平均回収率 [n=5](%)	相対標準偏差 (RSD%)	Mt比
うなぎ	0.01	85.8	3.2	0.98
	0.4	82.2	2.0	0.98
しじみ	0.01	81.5	6.8	0.99
	0.4	98.8	2.8	1.01

- ・ 添加濃度：0.01 mg/kg (定量下限濃度)
0.4 mg/kg (魚介類基準値濃度)
- ・ 目標値：回収率(真度) 70~120 %
相対標準偏差(併行精度) 15未満[添加濃度0.01<~≤0.1 mg/kg]
10未満[添加濃度0.1< mg/kg]

23

まとめ

- ・ 水産物中の殺虫剤シクロプロトリンの試験法として、試料からアセトンで抽出し、n-ヘキサンに転溶後、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、C18ミニカラム及びPSAミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した
- ・ 開発した試験法をうなぎ及びしじみに適用した結果、回収率(真度)は81.5~98.8%であり、良好な結果が得られた

24