畜水産物の試料調製中に起こり得る農薬等の分解抑制方法の検討

国立医薬品食品衛生研究所
〇坂井隆敏、根本　了、手島玲子

目的

添加回収試験において、ブランク試料に農薬等を添加して暫く放置すると、農薬等と食品の組合せによっては、抽出・精製、測定等の分析操作に問題が無いにもかかわらず低回収率となる場合がある。この原因としては、食品成分との反応による分解等により、農薬等が減少したことが推察される。

一方、食品中残留農薬等の分析では、一般に、依頼内容に応じて混合や均一化等の試料調製が行われ、その一部が分析に供されるが、上記のように添加・放置によって減少する農薬等と食品の組合せについては、試料調製中にも農薬等が減少し、正確な試料中濃度が得られない可能性がある。

本研究では、畜水産物を対象に、試料調製中に減少（分解）し易い農薬等の調査、並びにこれら農薬等の新たな分解抑制方法の検討を行った。

方法

① 対象食品

牛の筋肉、しじみ、牛の肝臓及び豚の肝臓

② 対象農薬等

畜水産物に基準値が設定されている農薬等のうち、LC-MS/MSで高感度な測定が可能（試料中0.01 mg/kgを定量可能）であった農薬206化合物、動物用医薬品145化合物

③ 試料調製における添加溶媒の検討

試料調製中の農薬等の分解抑制方法として、試料に溶媒を加えて均一化する方法について検討した。

適切な添加溶媒について検討するために、アセトン、アセトン及び水（1:1）混液、エタノール、エタノール及び水（1:1）混液を、数種類の畜水産物に等量加えて撹拌し、得られた調製試料の均一性を確認した。

また、牛の脂肪を用いた検討においては、操作中の重量変化の有無を確認した。

④ 試料調製中に分解する可能性が高い農薬等及び分解抑制効果の調査

フードプロセッサーを用いて細切均一化した各対象食品について、表1に従って添加試料を作成した。作成した添加試料について、アセトン抽出、アセトニトリル/ヘキサン分配及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製を行い、試験溶液を調製し、LC-MS/MSで測定した（表2）。

なお、各対象農薬等の添加濃度は0.01 mg/kgとした。

各対象農薬等について

「ピーク面積比（30分間放置/放置無し）」

を算出し、分解の程度及び分解抑制効果の指標とした。

⑤ 装置及び測定条件

HPLC

高速液体クロマトグラフ Acquity UPLC（Waters社製）; カラム Inertsil ODS-4 HP（内径3.0 mm × 長さ150 mm、粒子径3 μm、ジーエルサイエンス製）; カラム温度 40℃;
流速 0.4 mL/min; 注入量 5 μL;
移動相 20 mmol/L酢酸アンモニウム溶液（pH 4.5）（A液）及びアセトニトリル（B液）;
グラジエント条件（t: 時間（分））　t_0: B=1%、t_5: B=1%、t_{35}: B=100%、t_{40}: B=100%

質量分析

質量分析計 Acquity TQD（Waters社製）、
イオン化法 エレクトロスプレーイオン化（ESI）法、
ソース温度 150℃; 脱溶媒温度 400℃; 窒素ガス流量 800 L/h; コーンガス流量 50 L/hr;
キャピラリー電圧 1.5 kV

結果

① 試料調製における添加溶媒について

検討した添加溶媒のうち、エタノール及び水（1:1）混液を用いた場合において、種々の畜水産物との混和性及び均一性が最も良好であると判断され、また、均一化操作中の重量変化が最も少ないことが確認された。

② 試料調製中に分解する可能性が高い農薬等

未処理の添加試料において、30分間放置後にピーク面積が減少した（ピーク面積比0.7未満の）農薬等の数は、牛の筋肉で13、しじみで15、牛の肝臓で41、豚の肝臓で53であった。

③ 分解抑制効果

②に示した農薬等のうち、エタノール及び水（1:1）混液の添加によりピーク面積比が改善された（ピーク面積比0.7～1.2となった）農薬等の数は、牛の筋肉で5、しじみで6、牛の肝臓で25、豚の肝臓で28であった。

一方、未処理の添加試料におけるピーク面積比が0.7～1.2であった農薬等のうち、エタノール及び水（1:1）混液の添加によりピーク面積比が悪化した（ピーク面積比0.7未満もしくは1.2以上となった）農薬等の数は、牛の筋肉で1、しじみで2、牛の肝臓及び豚の肝臓ではともに0であった。

考察

操作性や実施の容易さなどを考慮し、試料調製中の農薬等の分解抑制方法として、試料に溶媒を添加して均一化する方法を検討した。

種々の畜水産物について均一な調製試料を得る必要があることから、検討する添加溶媒としては、各種試料との混和性等を考慮し、アセトンとエタノール、並びにこれら溶媒と水の混液（容積比で1:1の混液）を選択した。

検討した添加溶媒のうち、エタノール及び水（1:1）混液を用いた場合に、種々の畜水産物について均一な調製試料が得られ、操作中の重量変化もほとんど無いことが確認された。

このことから、エタノール及び水（1:1）混液を用いることで適切な試料調製及び調製試料の採取が可能であると考えられたため、本混液を添加溶媒として採用し、分解抑制効果を確認した。

エタノール及び水（1:1）混液を等量加えて均一化した試料においては、未処理の場合に添加・放置することでピーク面積が減少した農薬等の約半数について、ピーク面積の減少を抑制可能であることが確認された。このことから、これら農薬等と食品の組合せについては、試料調製中の分解をある程度抑制することが可能であると考えられた。

表1　添加試料の作成

		試料	操作①	操作②	操作③	放置の有無	操作④
添加試料の作成	添加試料①（未処理）	10.0 g	–	対象農薬等を添加、撹拌	対象農薬等を添加、撹拌	無	エタノール及び水（1:1）混液10 mL添加、撹拌
						有（30分間）	
	添加試料②（水）	10.0 g	水10 mL添加、撹拌	対象農薬等を添加、撹拌	対象農薬等を添加、撹拌	無	エタノール5 mL添加、撹拌
						有（30分間）	
	添加試料③（EtOH/水）	10.0 g	エタノール及び水（1:1）混液10 mL添加、撹拌	対象農薬等を添加撹拌	対象農薬等を添加、撹拌	無	–
						有（30分間）	
	添加試料④（AsA）	添加試料③の『エタノール及び水（1:1）混液』の替わりに、『50 mmol/Lアスコルビン酸溶液（エタノール及び水（1:1）混液）』を使用					

表2　試験溶液の調製及び測定

試験溶液の調製	抽出	アセトン100 mL及び酢酸1 mLを加えてホモジナイズ及び遠心分離。有機層を採り、残留物にエタノール及び水（1:1）混液10 mLを加えて撹拌後、アセトン50 mL及び酢酸1 mLを加えてホモジナイズ及び遠心分離。有機層を採り、先の有機層と合わせ、アセトンで200 mLに定容。この10 mLを採り、40℃以下で約1 mLまで濃縮。これに*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで3回振とう抽出。アセトニトリル層を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去。残留物にアセトニトリル及び20 mmol/L酢酸アンモニウム溶液（pH 4.5）（9:1）混液2 mLを加えて溶解。
	精製	予め、InertSep C18（1 g）にアセトニトリル5 mL、アセトニトリル及び20 mmol/L酢酸アンモニウム溶液（pH 4.5）（9:1）混液5 mLを順次注入して平衡化。このミニカラムに、精製①で得られた溶液を注入し、更にアセトニトリル及び20 mmol/L酢酸アンモニウム溶液（pH 4.5）（1:1）混液15 mLを注入。全溶出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去。残留物にアセトニトリル及び20 mmol/L酢酸アンモニウム溶液（pH 4.5）（1:1）混液1 mLを加えて溶解。
測定		得られた溶液を遠心分離し、上澄液をLC-MS/MSに注入

表3　試料調製中に分解する可能性が高い農薬等及び分解抑制効果

	化合物名	ピーク面積比（30分間放置/放置無し）×100														備考
		牛の筋肉			しじみ			牛の肝臓				豚の肝臓				
		未処理	水	EtOH/水	未処理	水	EtOH/水	未処理	水	EtOH/水	AsA	未処理	水	EtOH/水	AsA	
1	アルジカルブ	1.00	0.98	0.98	0.99	0.98	0.97	0.85	0.94	1.05	1.05	0.20	0.55	0.99	0.94	アルジカルブ、アルジカルブスルホキシドをアルジカルブに換算したもの及びアルドキシカルブをアルジカルブに換算したものの和。（平成25年6月27日以降から適用）
2	アルドキシカルブ	1.00	1.01	1.01	0.99	0.89	1.01	0.61	0.81	1.03	0.96	0.28	0.74	0.99	0.96	
3	イソフェンホス	0.98	0.97	0.98	1.01	0.99	0.99	0.62	0.56	1.03	0.95	0.85	0.86	0.98	1.01	イソフェンホス及びイソフェンホスオキソンをイソフェンホス含量に換算したものの和。
4	イソフェンホスオキソン	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	1.00	0.26	0.31	1.02	0.96	0.10	0.15	0.79	0.83	
5	イソメタミジウム	0.76	0.97	0.91	0.60	0.84	0.82	0.59	0.79	0.99	0.99	0.50	0.39	0.99	0.99	
6	イプロベンホス	1.00	0.92	1.00	0.97	0.97	0.99	0.88	0.86	1.01	0.98	0.50	0.58	1.00	0.99	
7	イミドカルブ	0.96	1.04	1.02	0.56	0.74	0.70	0.85	1.00	1.02	0.81	0.75	0.73	0.98	1.00	
8	エトパベート	1.02	1.02	1.03	1.01	1.00	1.00	0	0	0.98	1.01	0.09	0.11	1.00	1.00	
9	オキサミル	0.91	0.88	0.98	0.99	1.00	1.00	0.01	0.03	0.98	0.81	0.00	0.00	0.45	0.78	
10	カフェンストロール	1.00	0.97	1.00	1.01	1.00	1.00	0.17	0.14	1.00	0.97	0.01	0	0.97	0.95	魚介類においては、カフェンストロール及び3-(2,4,6-トリメチルフェニルスルホニル)-1,2,4-トリアゾールを カフェンストロール含量に換算したもののの和。その他の食品については、カフェンストロールのみ。
11	カルバリル	1.00	0.99	0.98	0.99	0.93	1.01	0.86	0.83	1.02	0.95	0.02	0.04	0.93	0.99	
12	クレソキシムメチル	0.99	0.99	1.00	0.99	0.98	0.98	1.01	1.00	1.02	1.01	0.40	0.30	1.00	0.98	畜産物にあっては、クレソキシムメチルと代謝物M9[2-(2-(4-ヒドロキシ-2-メチルフェノキシメチル)フェニル)-2-メトキシイミノ酢酸]をクレソキシムメチルに換算したものの和。その他の食品については クレソキシムメチルのみ。
13	クロメプロップ	0.98	0.97	1.01	0.99	0.94	0.99	0.94	0.98	0.97	0.94	0.17	0.21	0.89	1.00	畜産物にあっては、クロメプロップのみ。水産物にあっては、クロメプロップ及び代謝物B[2-(2,4-ジクロロ-m-トリルオキシ)プロピオン酸。別名クロメプロップ酸]を クロメプロップに換算したものの和。
14	ジニトルミド	0.98	0.99	1.00	0.74	0.80	0.94	0.29	0.29	0.84	0.83	0.19	0.43	0.88	0.84	
15	スルファキノキサリン	1.00	1.00	1.02	0.99	0.98	1.02	0	0	0.86	0.96	0.91	0.90	1.01	1.00	
16	スルファジアジン	0.99	1.01	1.01	0.94	0.95	0.97	1.02	1.03	1.05	1.01	0.60	0.81	1.04	1.00	
17	セフォピリン	0.44	0.37	0.96	0.63	0.95	0.98	0	0	0.81	0.97	0	0	0.80	1.01	
18	テメホス	1.02	1.02	1.02	0.98	0.98	1.04	1.01	1.00	1.02	1.00	0.38	0.43	1.00	1.00	
19	ピラクロホス	0.99	0.96	1.02	1.00	1.00	0.98	0.86	0.83	0.99	0.92	0.19	0.21	0.88	1.00	
20	ピリミカルブ	0.99	0.98	0.99	1.00	0.99	0.97	1.04	1.03	1.04	0.99	0.08	0.29	1.00	0.99	
21	フェナミホス	0.90	0.87	1.05	0.99	0.92	1.01	0.56	0.52	1.01	1.00	0.48	0.49	0.73	0.77	
22	フェノブカルブ	1.04	1.02	0.99	1.00	0.99	1.00	1.01	0.99	1.03	1.00	0.31	0.37	0.93	1.00	
23	フェントラザミド	1.01	0.99	1.02	1.00	0.98	1.00	0.01	0	1.01	0.91	0.07	0.14	0.75	0.93	フェントラザミドのみ。
24	フェンメディファム	1.01	1.01	1.01	0.98	0.98	0.98	0.56	0.55	1.06	0.97	0.04	0.08	0.98	1.00	
25	プロポキスル	1.01	1.01	1.00	0.99	0.99	0.99	0.89	0.96	1.02	0.99	0.03	0.18	0.90	0.94	
26	ベンジルペニシリン	1.01	1.00	1.00	0.47	0.65	0.81	0.88	0.94	1.00	1.02	0.80	0.91	0.99	0.99	ベネタメートの使用に基づくベネタメートの代謝物としてのベンジルペニシリンの残留を含む。
27	ベンダイオカルブ	1.01	1.00	1.04	0.94	0.94	0.96	0.81	0.87	1.05	0.97	0	0	0.98	0.94	
28	メタミドホス	0.98	1.00	0.99	0.96	0.97	0.99	0.51	0.65	1.02	0.98	0.48	0.72	0.95	0.93	アセフェート由来のメタミドホスを含む。
29	メビンホス（E体）	1.01	0.93	0.98	0.99	1.00	1.00	0.16	0.46	1.02	0.99	0	0	0.92	0.93	
30	3-メチルホスフィニコプロピオン酸	0.99	1.06	1.00	0.90	0.94	0.98	0.67	0.80	1.02	1.00	0.35	0.69	0.98	1.00	グルホシネートとは、農産物（穀類、豆類、種実類及びてんさいに限る。）にあっては、グルホシネートをグルホシネートアンモニウム塩に換算したもの、3-メチルホスフィニコプロピオン酸をグルホシネートアンモニウム塩に換算したもの及びN-アセチルグルホシネートをグルホシネートアンモニウム塩に換算したものの和。農産物（穀類、豆類、種実類及びてんさいを除く。）及び畜産物にあっては、グルホシネートをグルホシネートアンモニウム塩に換算したもの及び3-メチルホスフィニコプロピオン酸をグルホシネートアンモニウム塩に換算したものの和。なお、グルホシネートには、グルホシネートアンモニウム塩及びグルホシネートPが含まれる。
31	キザロホップエチル	0.96	0.94	0.95	0.87	0.90	0.91	0	0	0.70	0.99	0	0	0.03	0.34	キザロホップ、キザロホップエチル、キザロホップP、キザロホップPエチル及びキザロホップPテフリルが含まれる。
32	テトラクロルビンホス	1.02	1.00	1.06	1.00	1.00	0.99	0	0	0.97	1.04	0	0	0.54	0.64	
33	フェノキサプロップエチル	0.96	0.85	0.99	1.02	0.95	0.98	0.01	0	0.84	0.88	0	0	0.06	0.57	フェノキサプロップエチル、フェノキサプロップPエチルをフェノキサプロップエチル含量に換算したもの、フェノキサプロップをフェノキサプロップエチル含量に換算したもの、フェノキサプロップPをフェノキサプロップエチル含量に換算したもの及びCDHBをフェノキサプロップエチル含量に換算したものの総和。
34	ブタフェナシル	0.98	0.98	1.00	0.99	0.98	0.96	0.02	0.02	0.99	0.95	0.07	0.12	0.54	0.68	
35	プロフェノホス	0.97	1.00	0.99	0.97	0.97	0.97	0.21	0.18	0.99	0.94	0.21	0.29	0.56	0.39	
36	マラチオン	0.25	0.10	0.99	0.99	0.97	1.00	0	0	0.84	0.80	0	0	0	0.04	
37	メフェンピルジエチル	0.89	0.86	0.99	0.62	0.55	0.92	0	0	0.88	0.83	0	0	0	0.05	
38	2-アセチルアミノ-5-ニトロチアゾール	1.00	1.01	1.01	0.17	0.27	0.48	0.60	0.58	0.89	0.70	0.55	0.72	0.90	0.89	
39	アザメチホス	0.08	0.02	0.97	0.78	0.79	0.97	0.01	0	0.01	0.71	0	0	0	0.60	
40	イソシンコメロン酸ニプロピル	0.55	0.59	0.98	0.74	0.66	0.86	0.01	0.00	0.06	0.25	0	0	0	0.01	
41	カルフェントラゾンエチル	0.84	0.78	0.87	0.53	0.45	0.87	0	0	0.49	0.81	0	0	0	0.33	
42	クロキントセットメキシル	0.77	0.69	0.96	0.71	0.69	0.98	0.01	0	0.60	0.84	0	0	0	0.03	
43	イソキサフルトール	0.42	0.44	0.38	0.40	0.74	0.72	0.03	0.03	0.09	0.05	0	0	0	0	畜産物にあっては、イソキサフルトール及び代謝物B[2-シアノ-3-シクロプロピル-4-(2-メチルスルホニル-4-トリフルオロメチルフェニル)プロパン-1,3-ジオン]をイソキサフルトールに換算したものの和。
44	ナフタロホス	0.76	0.70	1.00	0.01	0	0.32	0.01	0	0.03	0.73	0	0	0	0.02	
45	フルアジホップブチル	0.88	0.83	0.91	0.74	0.67	0.92	0.01	0	0.26	0.69	0	0	0	0.01	フルアジホップをフルアジホップブチル含量に換算したもの、フルアジホップPをフルアジホップブチル含量に換算したもの、フルアジホップブチル及びフルアジホップPブチルをフルアジホップブチル含量に換算したものの総和。
46	プロパクロール	0	0	0	0.97	0.98	0.97	0	0	0	0.83	0	0	0.14	0.94	
47	メビンホス（Z体）	1.00	0.96	1.00	0	0	0.47	0	0	0.78	0.96	0	0	0	0.38	
48	カルボフラン	1.20	1.16	1.31	1.10	1.06	1.35	1.38	1.38	1.54	1.43	0.08	0.26	1.35	1.32	カルボフラン及びカルボフランの代謝物である3-OHカルボフランをカルボフラン含量に換算したものの和。ただし、カルボフラン又は3-OHカルボフランが検出され、加えてカルボスルファン、フラチオカルブ又はベンフラカルブが検出された場合には、それぞれの物質につき定められた規格基準を適用することとし、カルボフランに係る規格基準によらない。
49	フラチオカルブ	0.40	0.43	0.11	0.87	0.90	0.32	0.01	0	0.01	0.14	0	0	0	0.15	
50	ベンフラカルブ	0.95	0.95	0.95	–	–	–	–	–	–	–	0	0	0.26	–	
51	クロジナホップ酸	1.69	1.78	1.01	1.36	1.36	0.97	2.05	2.05	1.65	1.16	1.89	1.83	1.83	1.85	それぞれに基準値が設定されている。
52	クロジナホッププロパルギル	0.28	0.07	0.98	0.45	0.31	0.86	0	0	0	0.48	0	0	0	0	
53	チオジカルブ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	チオジカルブをメソミル含量に換算したもの及びメソミルの和。なお、メソミルにはメソミルオキシムが含まれる。
54	メソミル	1.73	1.72	1.70	1.73	1.70	1.72	0.63	0.92	1.49	1.49	0.13	0.42	0.83	1.03	
55	マラカイトグリーン	0.61	0.66	0.61	0.71	0.78	0.79	0.43	0.58	0.62	0.35	0.28	0.35	0.82	0.42	食品において「不検出」とされる農薬等の成分である物質として規定。マラカイトグリーンは、マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンを分析対象とする。
56	ロイコマラカイトグリーン	0.57	0.76	1.68	0.88	0.90	1.00	0.79	0.42	1.59	0.98	0.74	0.40	1.09	1.04	
57	ピノキサデン	0.06	0.06	0.06	0.14	0.15	0.36	0.01	0	0.06	0.23	0.15	0.25	0.10	0.21	
58	ピリデート	0.69	0.72	0.45	0.67	0.67	0.51	0.01	0.01	0.13	0.41	0	0	0	0.22	ピリデート及びピリデートヒドロキシ体をピリデート含量に換算したものの和。ピリデートには、ピリデートヒドロキシ体抱合体が含まれる。
59	フルミクロラックペンチル	0.98	0.96	0.93	0.25	0.20	0.62	0	0	0	0.11	0	0	0	0	
60	アトラジン	0.74	0.59	0.66	0.88	0.79	0.99	0.95	0.87	0.90	0.97	0.84	0.98	1.02	1.02	

ピーク面積比（30分間放置/放置無し）・・・　0.5未満　0.5以上0.7未満　0.7以上1.2未満　1.2以上

まとめ

畜水産物の試料調製中に起こり得る農薬等の新たな分解抑制方法について検討した。

試料にエタノール及び水（1:1）混液を等量加えて均一化することで、

① 種々の畜水産物について均一性の高い調製試料が得られる
② 試料調製中に分解する事が予想される農薬等の約半数について、分解を抑制可能である

ことが推察された。

本研究は、厚生労働科学研究費補助金（課題名　食品中残留農薬等のスクリーニング分析法の開発に関する研究）により実施した。