

Review

食品中の残留農薬分析について

坂 真智子

Residue Analysis of Pesticides in Food

Machiko Saka

The Institute of Environmental Toxicology

4321 Uchimoriyamachi, Joso, Ibaraki 303-0043

Abstract

Japanese positive list system for pesticide residues in food has been enforced since 2006. All pesticide residues in food including processed food products are regulated by this system except unlisted compounds. For enforcement purpose, residue analysis of pesticides in food is essential. However, we frequently meet across difficulties during determination of pesticide residues in food, since such matrices contain a variety of components including interferences for chromatographic analysis. So, residue analysis of pesticides generally consists of four steps classified as follows: 1) sample preparation, 2) extraction, 3) purification, 4) determination. In this paper, the important reminder and technical skills for residue analysis of pesticides in food are explained.

Keywords: Pesticide, Residue Analysis, Food

1. はじめに

平成18年5月29日に施行された食品衛生法によるポジティブリスト制度は、農薬等が一定の量を超えて残留する食品の流通を原則として禁止する制度である[1]。加工食品を含むすべての食品に残留した農薬等は、対象外物質を除き、すべてが規制されることになっている。すべての食品中の残留農薬分析が義務付けられているわけではないが、万が一、違反品が検出されてしまった場合のマイナス面を考慮すると必要以上の分析を実施しているのが現状であると思われる。また、一律基準(0.01ppm)の設定により、農作物の生産現場においても残留農薬の関心は高まっている。ドリフトや後作物への影響等は少なからず発生している。このような現状において、食品中の残留基準値を正確に分析して、把握する

ことが重要である。食品中の残留農薬分析は、多くの夾雑物の中の微量成分[ppb($\mu\text{g}/\text{kg}$)~ppm(mg/kg)]を測定しなくてはならない。食品によって夾雑物が異なるため、時として分析の困難な試料に出くわすことがある。そこで、食品中の残留農薬分析について解説して、注意点やノウハウ等を紹介する。

2. 分析方法

残留農薬分析の基本操作は、①試料調製(前処理)、②抽出、③精製、④定量の4つの段階に分類される。

2.1. 試料調製

分析に用いる試料が全体を反映させるように、分析する試

一般財団法人残留農薬研究所 化学部残留第2研究室

〒303-0043 茨城県常総市内守谷町4321番地

Tel: 0297-27-4515

Fax: 0297-27-4517

E-mail: saka@iet.or.jp

Table 1. 分解性農薬における試料の磨砕均一化法の一例

農薬名	磨砕均一化法
ジクロフルアニド	試料500g+0.1mol/L 硝酸銀50gを加え、均一化。
TPN、キャプタン、カブタホル	試料500g+10%リン酸50gを加え、均一化。
ジチアノン	有姿保存後、分析前に試料500g+飽和 NaCl: concHCl (9:1) 100mLを加え、均一化。
イミノクタジン	有姿保存後、分析前に試料500g+塩酸グアニジン [野菜25g、果実125g]を加え均一化。
トリフルミゾール	有姿保存後、分析前に試料500g+0.05mol/L リン酸緩衝液 (pH6.8) 500mLを加え、均一化。
カルボスルファン	有姿保存後、分析前に試料500g+0.2mol/L リン酸緩衝液500mLを加え、均一化。 抽出時、試料40g+0.1mol/L 硝酸銀 2 mL 添加。
チオファネートメチル	均一化した試料20g+L-アスコルビン酸ナトリウム 1 gを加えてメタノール抽出。 乾物試料：水浸漬要。
ピリフェノックス	試料500g+塩酸ヒドロキシアミン25gを加え、均一化。 種実等 5 g+塩酸ヒドロキシアミン0.25g+5%酢酸鉛溶液10mL+メタノール100mLで抽出。

料の広範囲から分取して調製する必要がある。分析に供する試料部位は、試験の目的によって異なる。

試料の種類に応じて調製器具を使い分けて、器具の使い回しによる汚染には十分気を付ける。残留濃度が把握できる場合には、残留濃度の低いものから順番に処理するように心がける。調製に使用する器具は分解、洗浄できるタイプのものを使用する。試料の均一化の際に分析対象化合物が分解を受ける場合には、分解防止剤等を加えて均一化を実施する。分解性農薬における試料の磨砕均一化法の一例[2]を Table 1 に示す。

残留分析のための試料は、速やかに分析に供することが大原則である。しかし、諸事情により試料を保存する場合には保存した期間における対象化合物の分解や損失がないことをデータで示す必要がある。通常は、均一化した試料（例えば 20g）に既知量の対象化合物を含む溶液（抽出溶媒と混和するもの）を添加した後、有姿試料を保存する条件と同じ条件で保存する。実試料を分析した後、もしくは同じ保存期間以上経過したのちに同様に分析して回収率を求める。原則として、個別添加で実施する。作物残留試験では保存安定性試験の回収率が70%以上（分析操作の回収率による補正なし）であることが要求されている。

2.2. 抽出

目的成分（農薬）を確実に試料から抽出するために、抽出効率の高い溶媒を使用する。通常は、公定法（告示や通知法）[3]で採用されている溶媒を使用する。均一化した試料を採取して抽出溶媒を加えた後、振とう機を用いて行う手法（振とう抽出）が主流である。試料の均一化が十分でなかったり、抽出溶媒を加えた段階で固化してしまったりする場合にはシャフト型ホモジナイザーを用いて抽出をすることができる。揮発性の高い農薬では特殊な装置（例えば Dean-Stark

装置等）を用いて溶媒に捕集する場合もある。食品で固形物試料から対象化合物を抽出したい場合にはソックスレー抽出装置を用いて時間をかけて抽出する。これらの段階では、目的成分以外にも多くの夾雑成分を含むことになる。

通常、乾物試料においては水を添加した後に極性有機溶媒（アセトン、アセトニトリル、メタノール等）を加えて抽出する。その必要性を示す検討結果として、水浸漬操作の有無と浸漬時間の分析結果への影響を比較したものを Figure 1 に示す。カルバリル、フェニトロチオン、マラチオンおよびダイアジノン分析対象とした玄米残留実試料（圃場で調製）を用いた。A：水浸漬操作なし（アセトンのみによる抽出）、B：水添加後、直ちに (B₀)、室温にて15分 (B₁₅)、30分 (B₃₀)、60分 (B₆₀)、120分 (B₁₂₀) 後に、アセトンを加えて抽出の6条件で比較した。条件 B₃₀による分析値を100として、その値に対する各条件での分析値の比率を示した。その結果、4薬剤すべてにおいて、アセトン (A) のみでは B₃₀による抽出率の6~68%と低い値であった。特に、カルバリルでは水添加の効果が顕著であった。一方、浸漬時間を比較すると、カルバリルおよびフェニトロチオンの分析値は120分間までの浸漬で大きな差は認められなかった。マラチオンおよびダイアジノンでは30分間を境に分析値が低下する傾向が認められた。この結果から、検討した薬剤において正確な残留値を把握するためには、水浸漬操作は必要であるが浸漬時間については15~30分間が適切であると示唆された[4]。

次に、高速高圧抽出装置（型式：E-916、日本ビュッヒ(株)製）を用いて玄米残留実試料からの農薬の抽出を検討した。エトフェンプロックス、フサライドおよびイミダクロプリドを対象農薬として、まずは抽出溶媒3種（アセトン、水浸漬後アセトン添加、アセトン/水 (80:20, v/v) 混液）を比較した (Figure 2)。アセトンのみ抽出では、検討した3薬剤すべてが低い比率を示した。特にイミダクロプリドが低

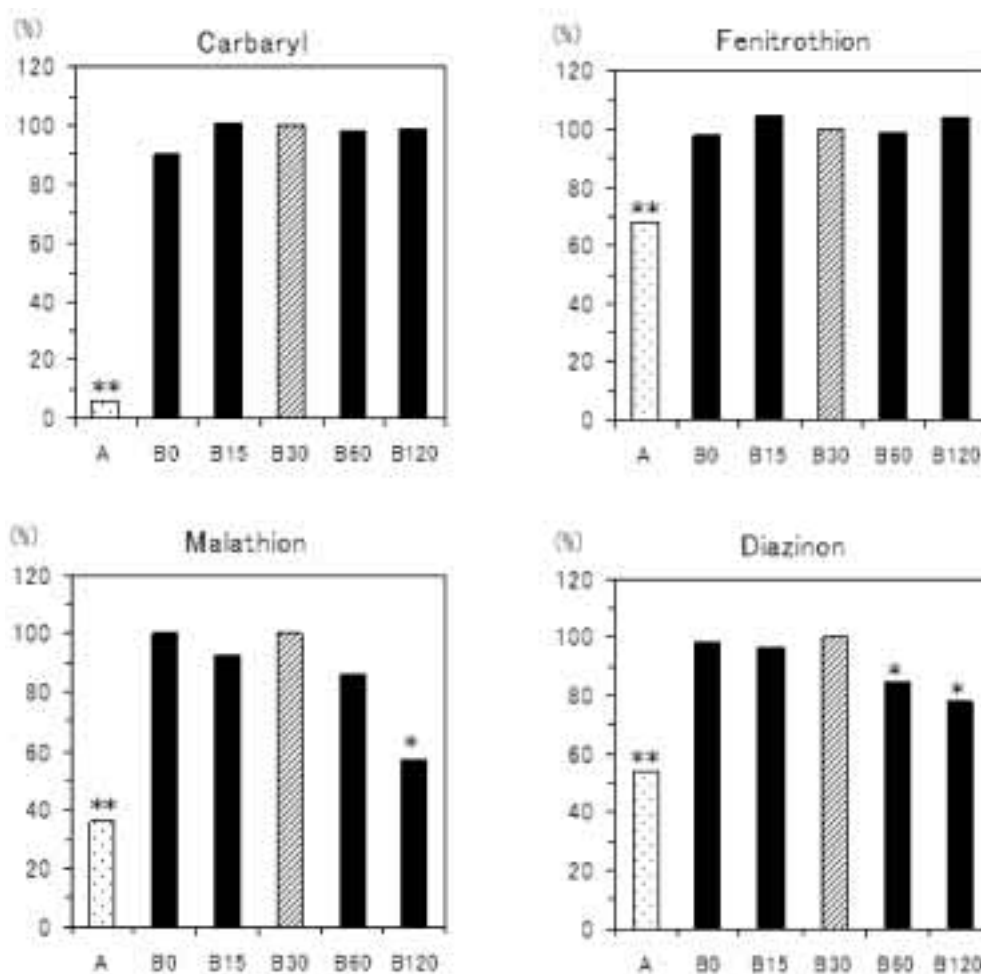


Figure 1. Effects of soaking in water on the extractability of pesticides with acetone in incurred brown rice samples. Sample were extracted with acetone without soaking in water (A), or after soaking in water [soaked for 0 min (B₀), 15 min (B₁₅), 30 min (B₃₀), 60 min (B₆₀), 120 min (B₁₂₀) at room temperature]. Each relative recovery is shown *versus* after water soaking for 30 min (B₃₀). Asterisks indicate significant differences (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) with the Dixon test. Authority is Reference 4.

かった。イミダクロプリドはアセトン/水 (80:20, v/v) 混液を使用した値もやや低い値であった。log Pow が小さい農薬は、アセトンのみでは抽出されにくいことが推察された。さらに抽出効率の改善を検討した。抽出にはアセトン/水 (80:20, v/v) 混液を用いて、圧力100bar で抽出温度40℃と80℃を比較した。結果を Figure 3 に示す。温度80℃において、検討したすべての農薬で良好な結果を得ることができた [5]。

抽出効率は、添加回収試験で判断することはむずかしい。特に水分含量の少ない乾物試料などでは、前述したように残留実試料を用いて抽出方法を検討する必要がある。実験操作の簡便性のみを追求して、安易に抽出方法を変更してはならない。

2.3. 精製

精製操作では、抽出段階で大量に含まれている夾雑物を各種操作により目的成分と分離する。精製は大きく二つに分類される。カラムクロマトグラフィーとそれ以外である。それ以外に含まれる操作としては、液々分配 (水/有機溶媒、アセトニトリル/ヘキサン)、誘導体化 (エステル化: ジアゾメタン、トリメチルジアゾメタン、*N*-メチル化: ヨウ化メチル、エーテル化: フルオロ-2,4-ジニトロベンゼン、アシル化: 無水ヘプタフルオロ酪酸、シリル化: BSTFA)、凝固処理 (塩化アンモニウム+リン酸、酢酸亜鉛)、酢酸鉛 (タンニン処理) がある。夾雑物の種類による精製手法の選択例を Table 2 に示す。

カラムクロマトグラフィーにはガラス製クロマト管 (内径 10~15mm) に充てん剤 (5~10g) を充てんして使用する

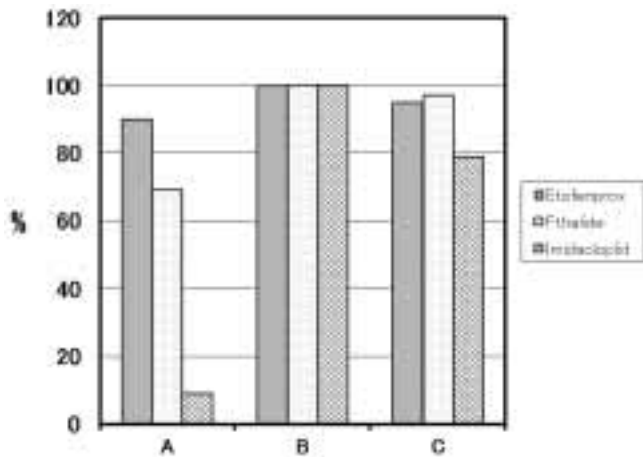


Figure 2. Effects of soaking in water on the extractability of pesticides with acetone in incurred brown rice samples. Sample were extracted with acetone without soaking in water (A), or after soaking in water soaked for 30 min (B), and acetone/water (80:20, v/v, C). Each relative recovery is shown *versus* after water soaking for 30 min (B). Authority is Reference 5.

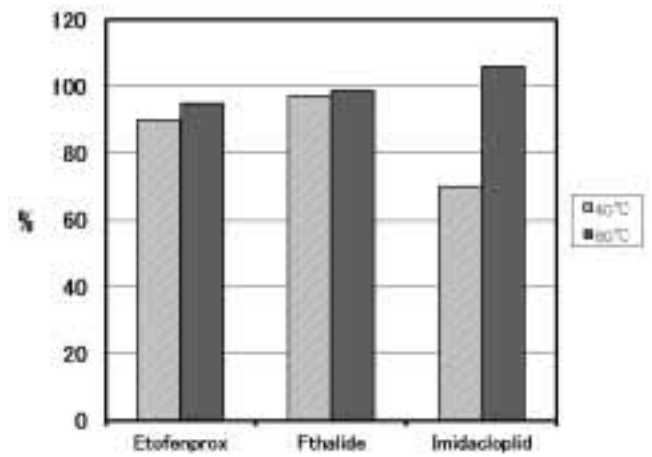


Figure 3. Comparison with extraction temperature by the Speed Extractor using acetone/water (80:20, v/v). The Speed Extractor (E-916 made by BUCHI) is pressurized solvent extraction. Each relative recovery is shown *versus* after water soaking for 30 min (Figure 2). Authority is Reference 5.

Table 2. 夾雑物の種類と精製手法の関係

夾雑物の種類	精製的手法
極性、非極性・夾雑物	液々分配、多孔性ケイソウ土カラム、塩析処理等
酸性、塩基性・夾雑物	液体間分配 (酸性条件又は塩基性で溶媒転溶)
脂質 (油脂類)	アセトニトリル・ヘキサン分配、多孔性ケイソウ土カラム、C18、GPC
色素 (葉緑素等)	GCB (グラファイトカーボン)、活性炭、C18、GPC 等
その他の微量夾雑物	シリカゲル、フロリジル、アルミナ、NH ₂ 、C18、PS 2

オープンカラムとあらかじめ充てん剤をポリエチレン製のカートリッジやシリンジに充てんした市販のミニカラムがある。オープンカラムは、吸着容量が大きく、分解能が高いという利点がある。水を混合することにより活性度 (吸着力) を調整できることも利点の一つである。しかし、溶媒の使用量が多く、時間がかかる点は欠点である。一方、ミニカラムは溶媒の使用量が少ない。製品の品質もほぼ一定であり、充てん剤の種類も多く、様々な種類の充てん剤を組み合わせ使用することもできるのは大きな利点である。ただし、試料夾雑物の過負荷による精製効果の低下には気をつけなくてはならない。また、活性度の調整はむずかしい。オープンカラムとミニカラムには各々に利点と欠点があるが、最近では実験室環境の改善、分析操作の簡便化などからミニカラムの使用が主流である。Table 3 にミニカラムの使用の目安[6]を示す。Table 4 にはミニカラム等の商品略称と一般名を示す。

最近では、液々分配の代替として多孔性ケイソウ土カラムを使用する場合がある。多孔性ケイソウ土は数 μm 以下の細

孔が無数に開いており、広大な表面積を有することから様々な物質を保持・固定化するための基材 (担体) として注目されている。主成分は二酸化ケイ素 (SiO_2) で化学的に活性が低く安定していることから、農薬の残留分析分野においても、試料を精製するためのカラムクロマトグラフィー用担体として用いられている[7]。多孔性ケイソウ土カラムにおける農薬の溶出パターンを Figure 4 に示す。GC で測定可能な約200種の農薬を 5%塩化ナトリウム溶液に溶解し、カラムに負荷した後、ヘキサン、5%アセトン/ヘキサン、酢酸エチルの各溶媒で順次展開したときの溶出率を示したものである。横軸は農薬の $\log \text{Pow}$ を表している[6]。

多孔性ケイソウ土カラムは、液々分配と比較してエマルジョンの形成がないこと、分配率が低い場合には溶出溶媒量を増加させると回収率が向上すること、多数の試料が同時に分析可能である等のメリットがある。一方、脂質の多い試料抽出液を負荷すると、回収率が低下する場合がある。この場合は抽出液にアセトニトリルを若干量添加することで回収率

Table 3. ミニカラム（カートリッジカラム）の使用の目安

	逆相用カートリッジ	順相用カートリッジ	イオン交換カートリッジ
	C ₁₈ CN tC ₁₈ C ₈	シリカゲル フロリジル アルミナ中性、塩基性、酸性 ジオール NH ₂	NH ₂ QMA（陰イオン交換） SAX（陰イオン交換） CM（陽イオン交換） SCX（陽イオン交換）
担体の極性	低い	高い	高い
使用溶媒の極性	中極性—高極性	低極性—中極性	高極性
サンプル溶解液	水 緩衝液	ヘキサン トルエン ジクロロメタン	水 緩衝液
代表的溶出液	水—メタノール 水—アセトニトリル	酢酸エチル アセトン アセトニトリル	酸性または塩基性溶液
成分の溶出順序	高極性成分から	低極性成分から	解離定数の小さいものから
強く保持されている成分の溶出	溶出液の極性を下げる	溶出液の極性を上げる	イオン強度を増す pH を上げる（アニオン交換） pH を下げる（カチオン交換）

Table 4. ミニカラム等の商品略称と一般名

商品略称	一般名
Silica	シリカゲルミニカラム
Florisil	合成ケイ酸マグネシウムミニカラム
Diol	グリセリルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム
Alumina A. N. B	アルミナ（酸性、中性、塩基性）ミニカラム
C2	エチルシリル化シリカゲルミニカラム
C8	オクチルシリル化シリカゲルミニカラム
C18	オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム
PS-2	スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム
HLB	ジビニルベンゼン-X-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム
PSA	エチレンジアミン-X-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム
QMA	アクリルアミド共重合体結合グリセリルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム
CH	シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム
SAX	トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム
SCX	ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲル
PRS	プロピルスルホンシリル化シリカゲルミニカラム
NH2	アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム
CBA	カルボキシメチルシリル化シリカゲルミニカラム
DEA	ジエチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム
LH-20	ヒドロキシプロピル化デキストラン
ENVI-CARB	グラファイトカーボンミニカラム
Chem Elut. Exrelut	多孔性ケイソウ土カラム

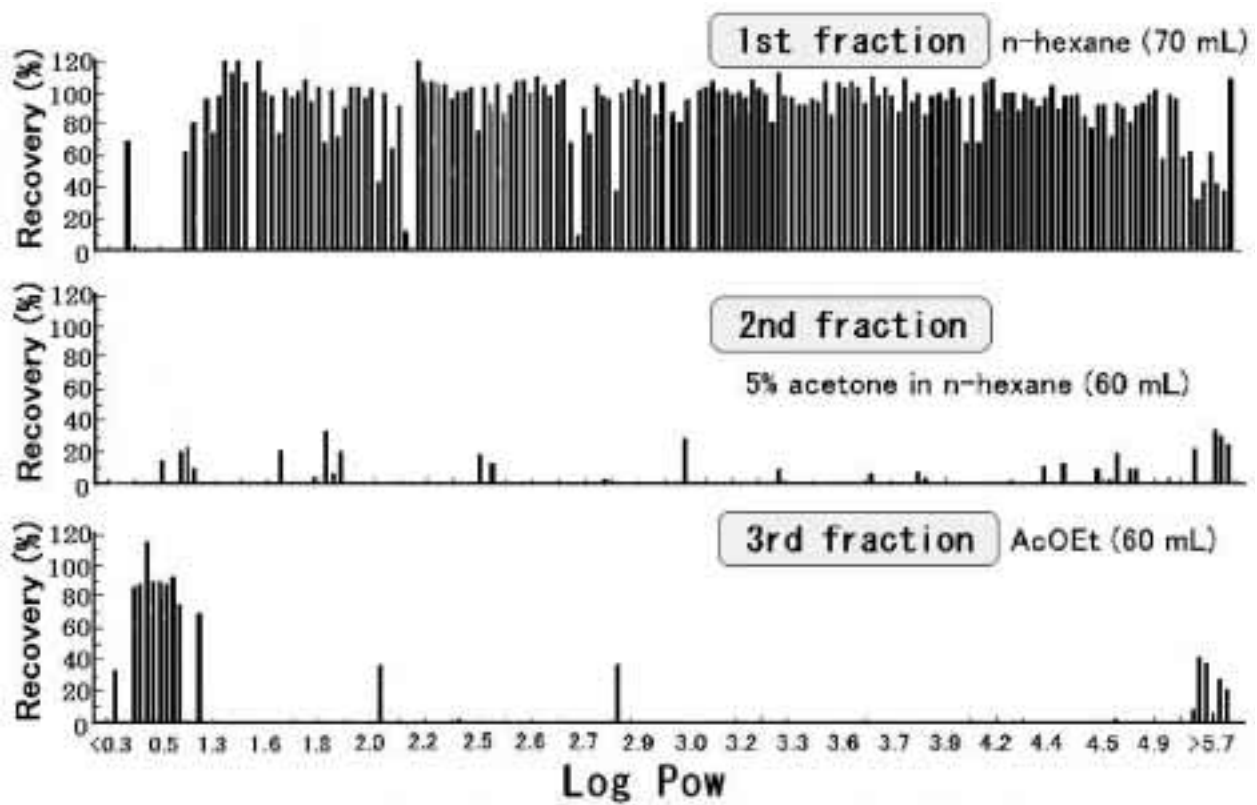


Figure 4. Elution Pattern of pesticides from C_{18} mini column (Bond Elut C_{18} 1 g/6 mL). Authority is Reference 6.

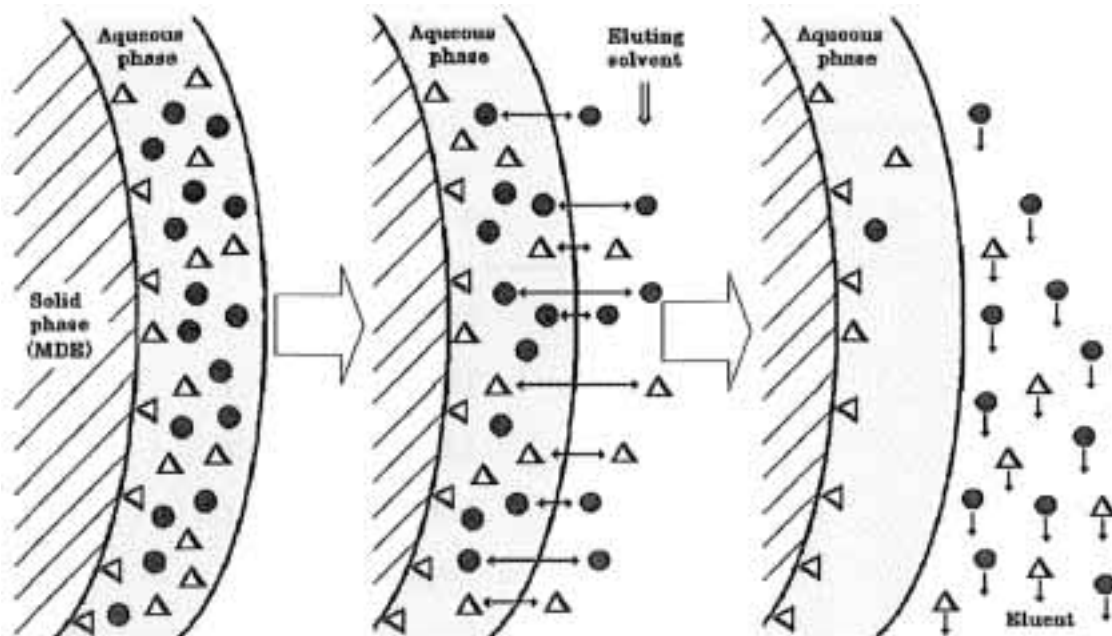


Figure 5. Elution model of on-column liquid-liquid extraction using a macroporous diatomaceous earth (MDE) column. The circle (●) and triangle (△) marks in this figure express general and extremely non-polar pesticides, respectively. Authority is Reference 8.

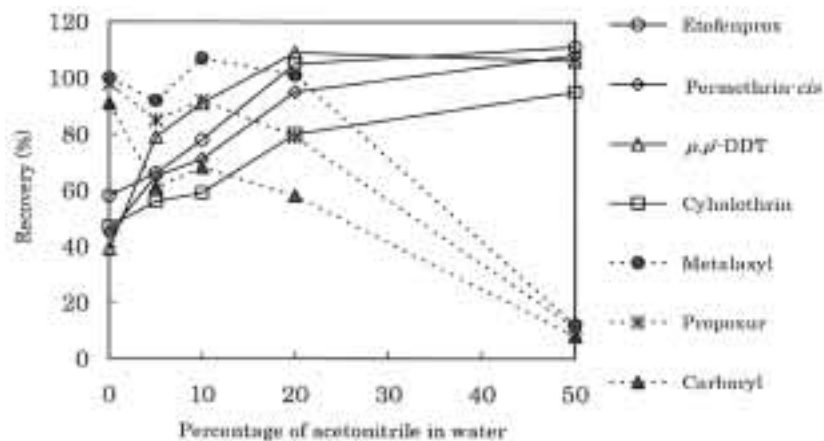


Figure 6. Effect of acetonitrile in the application solution on the recovery of pesticides from the MDE column. Authority is Reference 8.

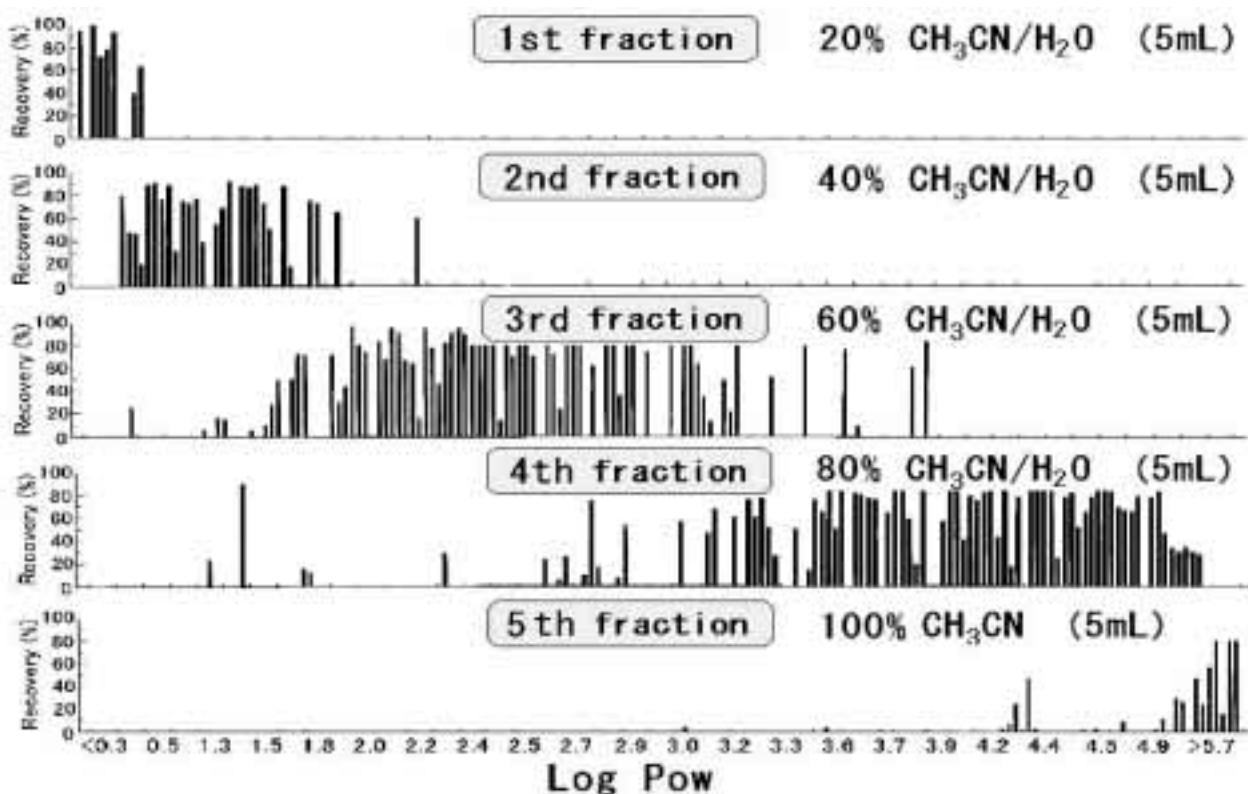


Figure 7. Elution Pattern of pesticides from silica gel mini column (Sep-Pak silica gel cartridge). Authority is Reference 6.

が向上するという報告がある。超非極性物質（合成ピレスロイド等）についても同様な現象が認められるが、試料溶媒に極性溶媒（アセトン、アセトニトリル等）を10~20%添加することで改善される[6]。その原理と検討結果を Figure 5 および 6 に示す[8]。

C₁₈ミニカラム（逆相用カートリッジ）は、展開溶媒の溶媒濃度を段階的に変化させ、相互作用を制御することにより、細かな分離・分画が可能であり、液々分配の代替としても利用可能である。Figure 7 は GC で測定可能な約200種の農

薬を水に溶解し、カラムに負荷した後、アセトニトリル濃度を20~100%まで段階的に変化させた時の溶出率を示したものである。横軸は農薬の log Pow を表している。溶出結果は、典型的な逆相溶出パターンを示している[6]。

2.4. 定量

農薬を定量するには、農薬標準品を用いて調製した標準溶液を測定機器に注入し、得られたクロマトグラムの強度（ピーク面積もしくはピーク高さ）と農薬の注入量（重量）

の検量線（回帰式）を作成する。これが絶対検量線法であり、残留農薬分析では一般的な手法である。この他に内部標準物質を用いた内標準法や試料成分を含んだ標準添加（マトリックス検量線）法などが使われている。いずれにしても、基準となる検量線を作成する標準溶液に問題があらはならないので、その調製や保存には十分に注意を要する。

残留農薬分析に主に使用される測定機器は、GC、GC-MS（/MS）、HPLC、LC-MS（/MS）などがある。30年ほど前にはGC-ECDやFPDが使われていて、次にGC-FTD、NPD、そしてGC-MSが加わり、GCが主流の時代があった。その後、HPLCの開発が進み、特にその付属品であるHPLCカラムの発展で残留農薬分析でもその使用が増えた。それから、LC-MSが登場して、その使用頻度は大きく飛躍した。現在では、分離系に質量分析を組み入れたLC-MS（/MS）やGC-MS（/MS）が主流となっている。新しい機器が開発されてきたと同時に、分析の目的が多成分分析に移行してきたという事実もある。ただし、LC-MS（/MS）やGC-MS（/MS）の質量分析計以外の選択型検出器もその用途によっては需要

があるため、分析の目的や状況によって使い分ける必要があると考える。選択型検出器付きGCについては、著者が執筆した実験技術講座「農薬残留分析編（第4回）」[9]を参考にさせていただきたい。

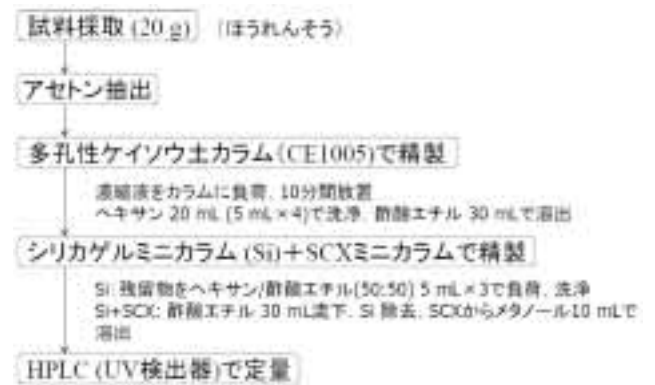


Figure 8. Analytical flow sheet for clotianidin in spinach sample by the HPLC method.

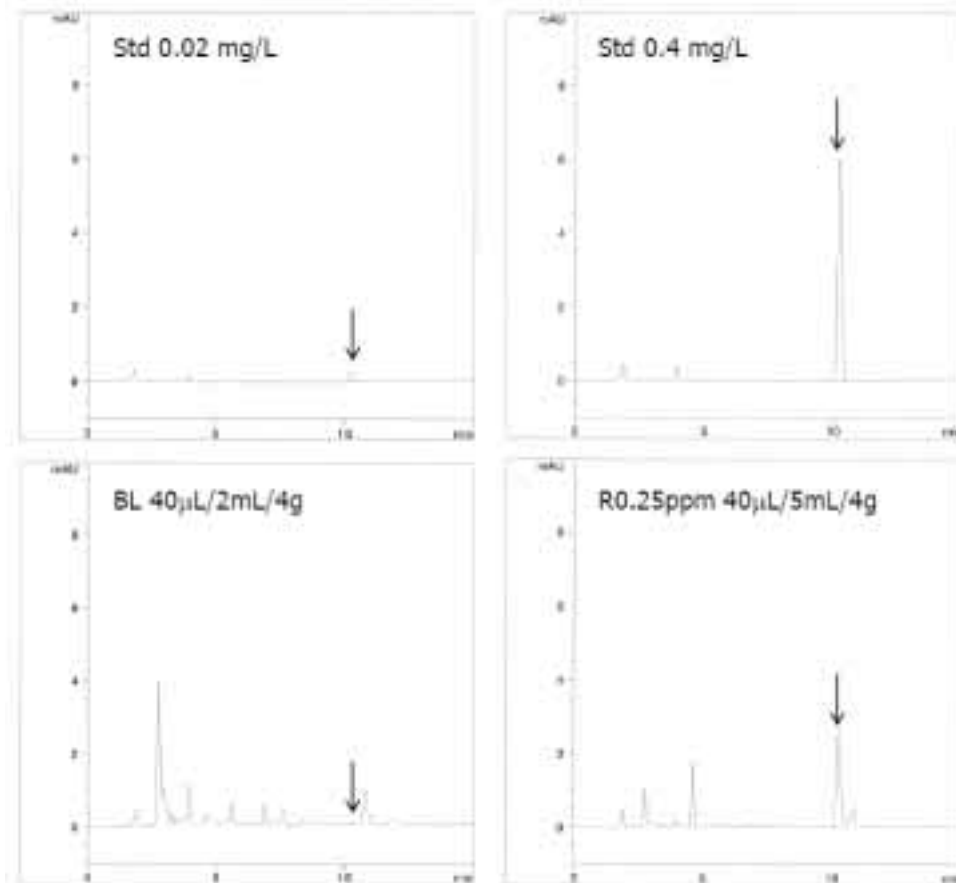


Figure 9. Representative HPLC chromatograms.

HPLC apparatus, 1260 Infinity (Agilent Technologies); column, L-column 2 ODS (5 μ m, 4.6 I.D., 250 mm, Chemicals Evaluation Research Institute); mobile phase, water/acetonitrile (80:20, v/v); flow rate, 1.0 mL/min; column temp., 40°C; wave length, 265 nm.

同じ対象化合物を違う測定方法で分析した事例として、ほうれんそう試料中のクロチアニジンの分析例を示す。クロチアニジン ($C_8H_8ClN_5O_2S$ 、分子量：249.68) はネオニコチノイド系殺虫剤である。ここでは精製に重点をおいて HPLC で分析した例 (アセトン抽出→多孔性ケイソウ土カラムおよびシリカゲルミニカラムで精製→HPLC で定量、Figure 8) と操作を簡略化して LC-MS で分析した例 (アセトン抽出→ C_{18} ミニカラムで精製→LC-MS、Figure 10) を示す。それぞれの代表的なクロマトグラムは Figure 9 と Figure 11 に示す。検出感度や特異性は LC-MS の方が高く、結果として簡便な分析を実施することができている。分析の再現性、測定感度の安定性では HPLC の方が優れていた。

3. まとめ

試料調製においては、適切な前処理を迅速に実施するよう

に心掛ける。抽出段階では、抽出効率を考慮した方法を採用する。基本的には公定法の抽出方法に従う。精製は、少ない

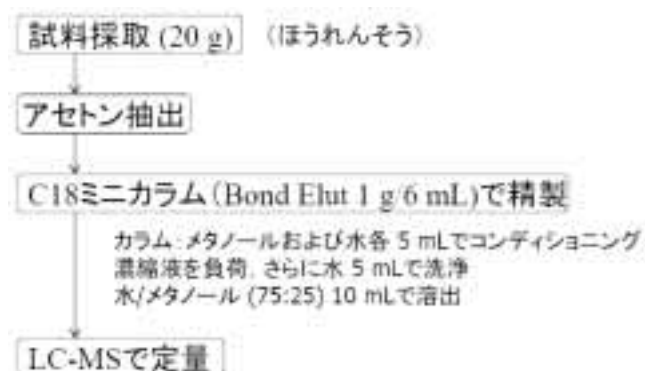


Figure 10. Analytical flow sheet for clotianidin in spinach sample by the LC-MS method.

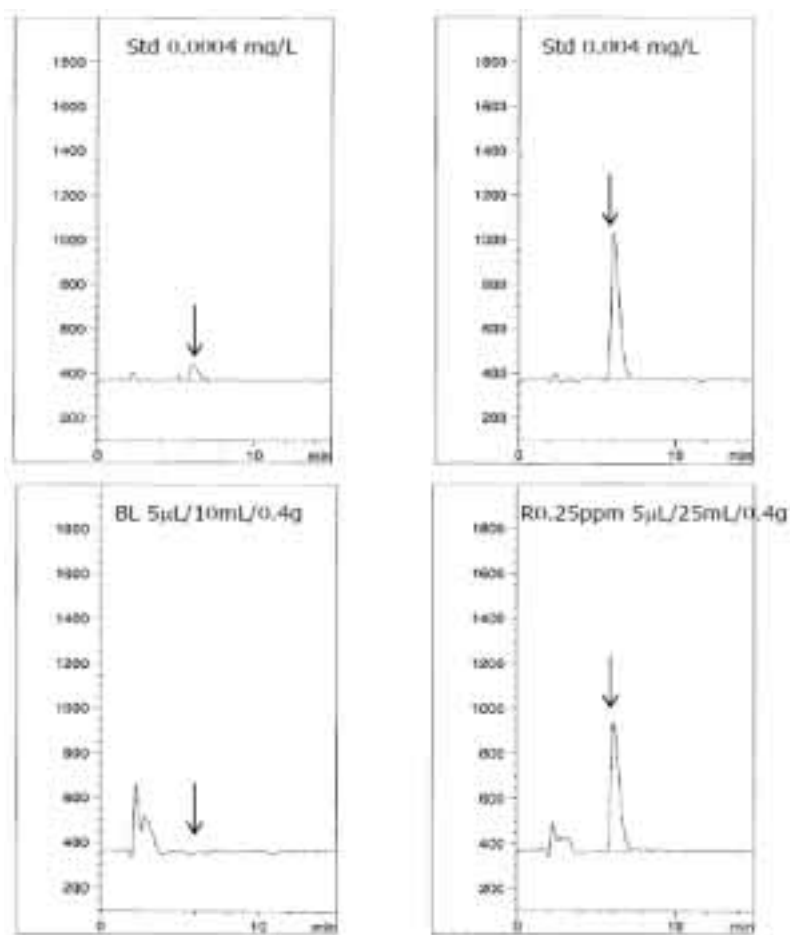


Figure 11. Representative SIM chromatograms (LC-MS).

LC-MS apparatus, 1100 LC/MSD (Agilent Technologies); column, Atlantis dC18 (3 μ m, 2.1 I.D., 150 mm, Waters); mobile phase, methanol/2 mmol/L ammonium acetate (35:65, v/v); flow rate, 0.2 mL/min; column temp., 40°C; ionization mode, Electrospray ionization (ESI); MSD signal polarity, NEGA; Drying gas flow and temp., 12.0 L/min, 350°C; vaporizer pressure, 10 L/min; capillary voltage, 3000V; Fragmentor voltage, 100V; selected ion, m/z 248.0 ($[M-H]^-$).

ステップで精製効果の高いものを採用する。ミニカラムを使用する場合には、負荷量に注意する。定量においては、検出限界、定量限界に基づいた結果の取りまとめを行う。クロマトグラムの確認を怠らない。最後に、記録は正確に残し、記録や報告書は第三者がみても理解できるように作成することが重要であり、望ましい。

分析法バリデーションや精度管理については、今回は解説していない。分析を実施する上で重要な事項であるので、実際に残留農薬分析を実施する上では留意していただきたい。

引用文献

- [1] 食品衛生法第十一条第三項，厚生労働省告示第497号，厚生労働省告示第498号（平成17年11月29日公布）。
- [2] 農薬残留分析研究班；中央法規出版：最新 農薬の残留分析法 改訂版，基礎編・資料編 **2006**, 24.
- [3] 食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物医薬品の成分である物質の試験法；厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知，食安発第1129001号（平成17年1月24日付），第1129002号（平成17年11月29日付）。
- [4] 坂 真智子；飯島和昭；粕 由紀子；藤田真弘；小田中芳次；加藤保博. *日本農薬学会誌* **2006**, 31(4), 431-434.
- [5] 坂 真智子；粕 由紀子；佐藤 清. 第33回農薬残留分析研究会要旨集 **2010**, 127-136.
- [6] 農薬残留分析研究班；中央法規出版：最新 農薬の残留分析法 改訂版，基礎編・資料編 **2006**, 36-47.
- [7] 上野英二. *日本農薬学会誌* **2010**, 35(1), 74-78.
- [8] 飯島和昭；坂 真智子；小田中芳次；加藤保弘；高田誠；細見正明. *日本農薬学会誌* **2006**, 31(2), 190-202.
- [9] 坂 真智子. *日本農薬学会誌* **2010**, 35(4), 580-586.