

## 残留農薬分析の抽出法に関する基礎的検討

### Study on Extraction of Multiresidue Pesticide Analysis in Fruit and Vegetables

氏家 愛子 長谷部 洋 柳田 則明  
Aiko UJIIE, Hiroshi Hasebe, Noriaki YANAGITA

H18年5月にポジティブリスト制度が導入されて、規制対象農薬数が約600種類と飛躍的に増大した。このため、迅速・簡便化が要望される一斉分析法の抽出法として、厚生労働省通知法のホモジナイザーによる抽出法に換えて、振とう抽出法の有用性について検討した。現在、濃度既知の食品標準試料がないため、分析法の妥当性評価について、標準添加試料を用いた回収試験で行う方法が一般的に行われている。本検討では、当所で従来から使用している振とう抽出（5分×2回）法の正確な抽出率の把握をするため、試料は農薬が多種類検出された実試料を用いた。また、振とう法と超音波抽出およびバイオミキサーによる抽出の併用も検討した。この結果、一斉分析では、低極性から高極性の幅広い多種類の農薬と多種類の品目を対象とするため、良好な回収率を得るためには、振とう抽出（5分×2回）に加え、試料を液状またはペースト状まで粉碎均一化できるバイオミキサーで1分間抽出する必要がある。

キーワード：残留農薬；一斉分析法；LC/MS/MS-MRM；振とう抽出

Key words：Multiresidue Pesticide；Simultaneous Analysis Method；LC/MS/MS-MRM；Shaking Extraction

#### 1 はじめに

残留農薬分析法の妥当性の評価については、食品中の濃度既知の標準試料がないため、農薬標準液を野菜等試料に添加する回収試験で行う方法が一般的に行われている。現在、当所でバリデーションを行い採用している一斉分析法<sup>1)</sup>には、従来から使用してきた振とう抽出法を取り入れており、この分析法による添加回収試験結果や外部精度管理の結果は良好であった。しかし、野菜等が生育時に吸収または吸着して含有する農薬について、振とう抽出による実試料からの抽出率は現在のところ把握できていない。振とう抽出法は、環境省の農薬登録保留基準の分析法<sup>2)</sup>にも多く採用され、また、Anastassiades, M.<sup>3)</sup>らの報告など迅速・簡便な一斉分析法に多く採用されているため、振とう抽出法の有用性を評価することは迅速・簡便化の観点から重要である。低濃度ではあるが、多種類の農薬が検出された野菜等の入手により、抽出液を精製せず希釈だけで高感度且つ選択的に分析できるLC/MS/MS-MRM法を用いて、振とう抽出法の有用性について検討した。

#### 2 方法

##### 2.1 試料

H18年度に行政検査を実施した野菜のうち、農薬が数種類以上検出されたきゅうり、日本なしおよび冷凍えだまめを使用した。試料は搬入当日、ミキサーまたはフードカッターにより細切して均一化し、保存袋に入れ即日凍結保存しておいたものを使用した。

##### 2.2 装置及び測定条件

LC/MS/MSはAgilent社製HPLC 1100 SeriesおよびApplied Biosystems社製API3000、超音波発生装置はシャープ(株)製UTB-152、振とう機は(株)ヤヨイ製

8-1-W、遠心分離機は久保田商事(株)製KN-45を用いた。試料の均一化に、National製ミキサーMX-V100およびNational製フードプロセッサーMK-K47を用いた。

LC/MS/MS分析条件を表1および表2に示した。

##### 2.3 試料の調製

抽出法の比較検討には、次に示す方法で試料を調製した。A法：各試料を解凍後20gをはかり取り、当所の従来法<sup>1)</sup>に準じ、1回目抽出にアセトニトリル30mlと食塩6gを加え5分間振とう後、遠心分離をしてアセトニトリル層を分取した。この残さにアセトニトリル20mlを加え5分間振とう後、遠心分離をしてアセトニトリル層を先のアセトニトリル層に合わせ、全量を50mlに定容した。B法：A法の振とう抽出前に超音波抽出10分を加えて、A法と同様に調製した。C法：A法の振とう抽出前にバイオミキサー抽出1分を加えて、A法と同様に調製した。また、振とう時間の検討には、当所の従来法に準じ抽出時間を5分～60分の範囲で変えて抽出を行った。アセトニトリルは1回目に50ml、2回目に20mlを用い、食塩を5gを添加して振とう抽出を行い、この抽出液を100mlに定容し試料液とした。これらの試料液を0.2 $\mu$ m-DISMIC(Millipore社製)でろ過し、LC/MS/MS試験液とした。

表1 LC/MS/MS測定条件

Column:	CAPCELL PAK C18 AQ (S-3 $\mu$ m, 2.0mm i.d. × 150mm, Shiseido)
Mobile phase conditions:	A: 1mmol-CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> ・0.01%HCOOH B: CH <sub>3</sub> CN initial, 100% A → 5min, 0% A → 16min, 0% A → 16.1min, 100% A → 21min, 100% A, Flow rate: 0.2mL/min
Column oven temp.:	40°C, Injection volume: 5 $\mu$ L
Positive mode:	Ion source temperature: 500°C, Curtain gas: 10L/min, Ion spray potential(V): 5000V, Collision gas: 8L/min, Nebulizer gas: 12L/min, Auxiliary gas: 6L/min
Negative mode:	Ion source temperature: 450°C, Curtain gas: 10L/min, Ion spray potential(V): -4500V, Collision gas: 6L/min, Nebulizer gas: 15L/min, Auxiliary gas: 6L/min

表2 LC/MS/MS-MRM 測定条件と標準添加回収率

農薬名	測定 モード	Precursor ion	Product ion	Collision Energy	Retention Time (min)	冷凍えだまめ(n=3)	
						Recovery (%)	RSD(%)
Imidacloprid	n	254	153	-18	9.56	93	10
Methabenzthiazuron	n	220	163	-14	10.73	79	16
Inabenfide	n	337	122	-26	10.82	89	6.9
Dymron	n	267	106	-50	11.00	85	4.7
Tebufenozide	n	351	149	-30	11.18	87	8.0
Diflubenzuron	n	309	289	-12	11.20	91	4.6
Famoxadone	n	373	282	-28	11.25	93	9.5
Pencycuron	n	327	111	-30	11.55	90	5.2
Hexaflumuron	n	459	439	-14	11.61	87	6.6
Iprodione	n	328	141	-16	11.79	100	1.7
Lufenuron	n	509	326	-24	11.97	85	8.8
Teflubenzuron	n	379	339	-16	12.12	91	8.4
Flufenoxon	n	487	156	-22	12.17	85	16
Chlorfluazuron	n	540	520	-18	12.45	84	1.9
Methamidophos	p	142	94	23	2.30	82	2.2
Acephate	p	184	143	13	2.39	85	14
Omethoate	p	214	183	17	8.14	98	4.8
Aldicarb-sulfoxide	p	207	132	11	8.55	93	1.7
Nitenpyram	p	271	126	35	8.74	83	12
Pymetrozine	p	218	105	41	8.74	81	16
Aldicarb-sulfon	p	223	148	15	8.76	110	8.0
Oxamyl	p	237	72	27	9.00	110	7.9
Methomyl	p	163	88	19	9.18	100	4.2
Ethiofencarb-sulfon	p	258	107	21	9.40	100	5.1
Ethiofencarb-sulfoxide	p	242	107	27	9.44	100	3.0
Methiocarb-sulfoxide	p	242	185	21	9.57	100	1.8
Acetamiprid	p	223	126	27	9.68	99	5.4
Methiocarb-sulfon	p	258	122	23	9.70	97	4.8
Dimethoate	p	230	125	30	9.71	94	7.7
Cymoxanil	p	199	128	13	9.83	110	4.4
Spinosad	p	732	142	39	9.95	97	2.0
Aldicarb	p	208	116	11	10.04	101	1.4
Thiophanate-methyl	p	343	151	39	10.16	92	4.3
Bendiocarb	p	224	167	15	10.21	88	3.0
Carbaryl	p	202	145	13	10.35	100	1.9
Ethiofencarb	p	226	107	23	10.42	82	14
Pirimicarb	p	239	72	31	10.49	98	1.5
Thiophanate	p	371	151	33	10.53	95	2.4
Desmedipham	p	301	182	13	10.57	98	1.7
Fenobucarb	p	208	95	23	10.74	100	5.0
Diethofencarb	p	268	226	15	10.79	89	2.7
Dimethomorph	p	388	301	31	10.87	100	3.0
Methiocarb	p	226	169	15	10.88	96	3.8
Linuron	p	249	160	27	10.93	92	1.1
Cumyluron	p	303	185	21	10.95	96	0.6
Ferimzone	p	255	91	47	10.99	97	1.2
Fipronil	p	435	330	-20	11.06	91	6.4
Bensulide	p	398	158	33	11.08	100	14
Phenthoate	p	321	135	29	11.25	95	4.2
Alanycarb	p	400	238	17	11.27	100	15
Kresoxim-methyl	p	314	116	20	11.30	96	12
Di-clomezine	p	255	141	45	11.33	91	10
Pyrazoxyfen	p	403	91	59	11.35	98	3.2
Ethobenzanid	p	340	121	45	11.36	100	2.9
Bitertanol	p	338	70	43	11.39	89	6.5
Propicanazole	p	342	159	40	11.39	95	1.8
Phoxim	p	299	129	17	11.46	100	10
Difenoconazole	p	406	251	37	11.53	98	5.3
Cyprodinil	p	226	108	35	11.55	95	1.6
Clofentezine	p	303	138	27	11.69	95	5.4
Fluazinam	p	463	416	-28	11.92	97	6.4
Imibenconazole	p	411	125	41	11.93	100	4.7
Terbufos	p	289	103	15	11.95	87	6.9
Hexythiazox	p	353	228	21	12.17	90	2.7
Cycloxydim	p	326	280	21	12.20	92	2.7
Chlorpyrifos	p	352	200	30	12.24	96	2.6
Pyrimidifen	p	378	184	35	12.27	98	0.7
Cypermethrin	p	416	191	17	12.44	83	8.2
Fenpyroximate	p	422	366	25	12.58	98	1.0
Permethrin	p	391	183	28	13.20	92	8.4
Etofenprox	p	394	177	23	13.36	95	7.9
Silafuofen	p	287	168	33	14.40	76	16

p: positive mode ,n: negative mode

## 3 結果

## 3.1 従来法による添加回収試験

農薬が検出されなかった冷凍えだまめに、表2に示した72種類の農薬標準液を試料換算で5ng/gとなるよう添加をし、A法により試料溶液を調製した。抽出率だけを評価するため、精製を行わず0.2 $\mu$ mのフィルターによるろ過だけでLC/MS/MS-MRM (Multiple Reaction Monitoring) 分析を行った。72農薬全ての回収率は76%~110% (RSD0.6%~16%, n=3)であり、添加試料からのA法による農薬の回収率は、良好な結果が得られた(表2)。

## 3.2 抽出法による比較

実試料からの抽出率の把握をするため、均一化状態が異なる試料を用いて検討を行った。試料は、ミキサーまたはフードカッターで細切して均一化するため、試料によっては液状やペースト状まで完全に均一化することはできない。このため、振とう抽出だけでは抽出が不十分であると考えられ、振とう抽出前に補助抽出操作を加える方法も検討した。すなわち、超音波抽出を10分加えたもの(B法)、およびバイオミキサー抽出を1分加えたもの(C法)で比較を行った。図1に示したように、液状に均一化したきゅうり(図2に示す5農薬含有)、ジュース状であるが果皮が不均一に分散した日本なし(同6農薬含有)、およびペースト状であるが鞘が不均一に混合している冷凍えだまめ(同12農薬含有)を用いた。厚生労働省の通知法<sup>4)</sup>とほぼ同程度の抽出率であったC法の濃度を基準にして、A、B法の抽出率の比率を図2に示した。なお、対象とした農薬濃度が数ppbと低濃度のものがあったため、抽出用アセトニトリルは従来法より少ない量(1回目30ml, 2回目20ml)を用いて行った。

きゅうりの場合、5農薬のA/Cは89%~104%、B/Cは96%~101%とA、B、C3法による抽出率は、ほぼ同程度であった。きゅうりのように液状に均一化された試料からの農薬の抽出は、A法でも良好であると推察された。

日本なしの場合、メソミル、イミダクロプリドの抽出率A/Cは80%以上であったが、残る4農薬は、28%~53%であった。B/Cは、シラフルオフェンが58%と低く、これらの低抽出率の農薬は水溶解度が低く、オクタノー

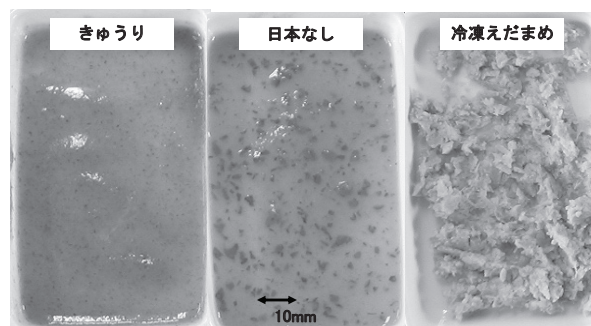


図1 各試料の均一化状態

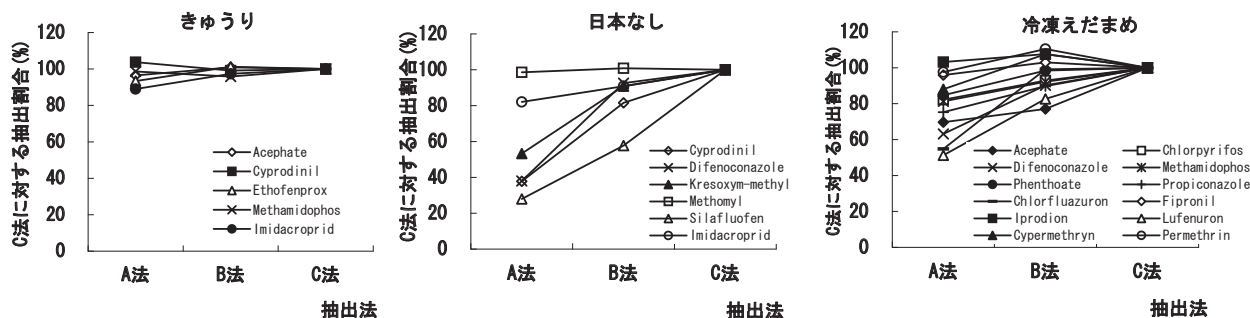


図2 抽出法別抽出率の比較 (n=3)

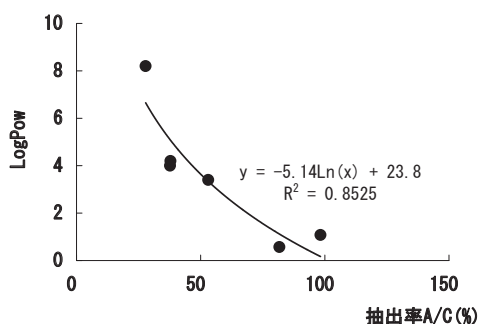


図3 振とう法 (5分) の抽出率と LogPow

表3 抽出法別残留農薬濃度 (冷凍えだまめ)

抽出法	振とう抽出: 振とう時間 (min)				通知法
	5	15	30	60	
農薬名					
Chlorfluzuron	1.2±0.1	1.5±0.3	2.2±0.2	2.8±0.9	2.8±0.3
Fipronil	2.4±0.1	2.5±0.2	2.6±0.1	2.6±0.1	3.0±0.1
Iprodion	4.3±0.1	4.7±0.7	5.7±1.0	6.4±1.6	5.8±0.5
Lufenuron	4.1±0.4	5.3±0.3	5.2±0.6	4.6±0.4	5.0±0.7
Acephate	17±1.7	14±3.1	15±2	15±1.2	16±0.6
Chlorpyrifos	32±0.5	36±0.6	37±0.8	40±0.3	43±4
Cypermethrin	130±6.4	150±11	160±2	190±3	180±13
Difenoconazole	9.6±0.3	12±0.3	10±0.2	11±0.1	15±1.0
Methamidophos	3.3±0.2	3.6±0.3	3.9±0.1	4.6±0.2	4.0±0.2
Phenthoate	9.3±0.5	11±0.3	12±0.1	11±1.0	13±1.0
Propiconazole	11±0.3	13±0.3	12±0.3	14±0.2	17±0.5
Permethrin	99±9	110±12	110±15	140±4	130±11

ル分配係数 (LogPow) が高い農薬であった (図3)。日本なしについて、新目ら<sup>5)</sup> は果皮と果肉中の農薬分布を調査し、果皮中濃度が果肉中濃度の数倍~数十倍高いことを報告しており、果皮に付着した低極性農薬が、振とうまたは超音波による抽出だけでは、極性の高い水/アセトニトリル混合層に移行し難いことが原因と考えられた。日本なしのように、果皮を果肉と全く同様な液状に均一化できない果実等は、A法およびB法では抽出が不十分であると推察された。

また、冷凍えだまめの場合、抽出率 A/C は、LogPow が高い尿素系農薬のクロルフルアズロン及びルフェヌロンが 55%, 51%, トリアゾール系農薬のジフェノコナゾールが 63% であり、A法による抽出では不十分であった。B/C は 77% (アセフェート) ~ 110% であり、超音波抽出を加えることにより抽出率が増大した。えだまめは鞘と豆をホモジナイズして試料とするため、水分含量が少なくペースト状であり、超音波をかけることにより、LogPow が高いクロルフルアズロン、ルフェヌロンおよびジフェノコナゾールが、アセトニトリル層に移行しやすくなったものと考えられた。冷凍えだまめのように、水分含量が少なくペースト状に均一化された試料は、振とう抽出に超音波抽出を 10 分加えることで、良好な抽出率を得ることができた。

従来法の振とう時間 5 分での 2 回抽出をベースに、それぞれ超音波またはバイオミキサーによる操作を追加した 3 抽出法の比較検討の結果、食品全般の抽出法として

は C 法が優れており、振とうの前に、バイオミキサーにより試料を 1 分間ホモジナイズする操作が必要であることがわかった。

### 3.3 振とう時間と抽出率

約 600 農薬が分析対象となっている現在、一斉分析法でも QuEChERS<sup>3)</sup> 法に代表されるように迅速簡便化が要求されている。上記バイオミキサーによる操作は、刃の洗浄や交換等、多検体の同時並行分析において煩雑であり、コンタミネーションの懸念もある。振とう操作だけで十分な抽出率を得ることは、分析の迅速・簡便化を図る上で非常に有用である。

そこで、適切な振とう時間の検討に、従来法の振とう時間を 5 分~60 分の範囲で変更し、時間と抽出率について検討した。試料は、農薬 12 種類を含有する冷凍えだまめを用いた。抽出率を比較するため、基準抽出率に厚生労働省の通知法<sup>4)</sup> に準じた抽出を行った。振とう時間と抽出率を表 3 に示した。振とう時間と 12 農薬の抽出率の関係は、振とう時間 5 分で 43%~107%、15 分で 51%~106%、30 分で 71%~105%、60 分で 78%~115% であり、振とう時間の増加に伴い、増大する傾向にあった。一方、揮発性のあるアセフェートは時間が長くなると低下する傾向があった。これらの値は粗抽出での値であり、通常、GC/MS や LC/MS/MS に注入する前に抽出液に精製操作を加える。精製工程での回収損失を考慮すると、回収率として 70% 以上を得るためには、振とう時間に 60 分必要であり、振とう時間だけでも 2

時間を必要とするため、迅速化の観点では、バイオミキサーと振とう法（振とう時間5分×2回）を併用するC法の方が有用と考えられた。

### 3.4 農薬の物性と抽出率の関係

振とう時間を変更して抽出したそれぞれの濃度平均値と、通知法に準じて抽出した濃度平均値を各農薬のデータとして、農薬間の相関を求め、相関係数の検定を行った結果を表4に示した。検定は、相関係数Rから次式  $t = \sqrt{n-2}R / \sqrt{1-R^2}$  によりt値を求め、危険率(5% or 1%)と自由度(n-2)のt分布表値と比較して大きい場合に、農薬間の抽出率に相関ありと判定した。この結果、LogPowおよび水溶解度が酷似しているクロルフルアズロンとシペルメトリン、分子構造が酷似しているシペルメトリンとペルメトリン、およびプロピコナゾールとジフェノコナゾールに有意水準1%で高い相関が認められた。今回、対象とした品目

表4 抽出濃度間の相関 (t 値)

農薬名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-											
2	-	-										
3	5.76*	-	-									
4	-	-	-	-								
5	-	-	-	-	-							
6	3.76*	4.93*	-	-	-	-						
7	5.86**	-	4.60*	-	-	4.20*	-					
8	-	5.08*	-	-	-	3.71*	-	-				
9	3.33*	-	6.95**	-	-	-	4.10*	-	-			
10	-	3.69*	-	-	-	3.69*	-	-	-	-		
11	-	5.82*	-	-	-	5.11*	-	13.7**	-	-	-	
12	3.87*	-	-	-	-	3.37*	6.94**	-	-	-	-	-

注) 農薬名: 1; Chlorfluazuron, 2; Fipronil, 3; Iprodion, 4; Lufenuron, 5; Acephate, 6; Chlorpyrifos, 7; Cypermethrin, 8; Difenoconazole, 9; Methamidophos, 10; Phenthoate, 11; Propiconazole, 12; Permethrin.

\*: 有意水準 5%で相関あり, \*\*: 有意水準 1%で相関あり, -: 相関なし

に含有する農薬は、のべ18農薬だけであったが、多種類の農薬一斉分析の抽出においては、LogPow, 水溶解度, 分子構造などが類似している農薬は、同様な挙動を示すことが示唆された。

### 4 まとめ

農薬一斉分析法の抽出法としての、振とう抽出法の有用性の検討を行った。一斉分析では、低極性から高極性の幅広い多種類の農薬と多種類の品目を対象とすることから、良好な回収率を得るためには、従来法である振とう抽出(5分×2回)に加え、試料を液状またはペースト状まで粉碎均一化できるバイオミキサーで1分間抽出する必要があった。

### 参考文献

- 1) 氏家愛子, 佐藤信俊: 宮城県保健環境センター年報, 23, 55 (2005).
- 2) 「今月の農業」編集室編: "農薬登録保留基準ハンドブック, 作物・水質残留基準と試験法", 改訂4版, (2003), (化学工業日報社).
- 3) Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., & Schenck, F.S.: J. AOAC Int., 86, 412-431 (2003).
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 "食品に残留する農薬, 飼料添加物又は動物用医薬品に成分である物質の試験法について (一部改正)" 平成17年11月29日, 食安発第1129002号 (2005).
- 5) 新目真弓, 菊池秀夫, 氏家愛子, 大江浩: 宮城県保健環境センター年報, 9, 176-177 (2001).