

※本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

残留農薬等に関するポジティブリスト 制度導入に係る分析法開発

EPTC 試験法
(畜水産物)

EPTC 試験法の検討結果

[概要]

EPTC の個別分析法について検討した。EPTC はチオカーバメイト系農薬で、GC/MS による農薬等の一斉試験法(畜水産物)の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び魚介類を対象とした分析対象化合物に採用されているが、乳、卵及びはちみつでは分析対象となっていない。そのため筋肉等の試験法と同様の抽出法を用い、GC-NPD で測定する EPTC の個別分析法を検討した。

[目的]

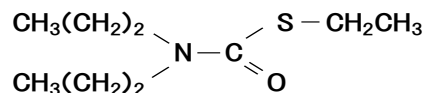
食品衛生法に基づく残留農薬基準が設定されている農薬のうち、現在までに残留農薬公定試験法が確立されていない農薬について、個別分析法を開発し、公定試験法の作成を行うことを目的とする。

[実験方法]

1. 検討対象農薬

EPTC

構造式：



分子式：C₉H₁₉NOS

分子量：189.3

化学名(IUPAC)：S-ethyl dipropylthiocarbamate

CAS No.：759-94-4

オクタノール/水分配係数：log Pow 3.2

蒸気圧：1.0E-4 mPa (25°C)

(出典：The Pesticide Manual 17th ed.)

2. 試薬等

EPTC 標準品：97.0%、Dr.Ehrenstorfer 社製

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム：MEGA BOND ELUT-FL 1GM/6ML
(アジレントテクノロジー (株))

ジエチレングリコール：特級、99.5% (関東化学(株))

その他の試薬等は残留農薬分析用を用いた。

3. 試料

東京都内のスーパーマーケット及び小売店で市販されていた畜水産食品（牛筋肉、牛脂肪、牛肝臓、豚筋肉、サケ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵及びはちみつ）を用いた。

各食品の試料採取の方法を以下に示した。

牛筋肉：可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。

牛脂肪：可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した。

牛肝臓：全体を細切均一化した。

豚筋肉：可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。

サケ：可食部（皮を含む）を細切均一化した。

うなぎ：頭を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）を細切均一化した。

しじみ：貝殻を除き、細切均一化した。

牛乳：全体をよく混合して均一化した。

鶏卵：殻を除き、卵白と卵黄をよく混合し均一化した。

はちみつ：容器内の試料をスパートルで混合し均一化した。

4. 装置

GPC：G-Prep GPC8100（ジーエルサイエンス(株)）

GC：Agilent 7890A

GC/MS：Agilent 6890/5973

5. 測定条件

GC-NPD

カラム：DB-5 内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m

カラム温度：60 $^{\circ}$ C（2分）－15 $^{\circ}$ C/分－200 $^{\circ}$ C（2分）－5 $^{\circ}$ C/分－280 $^{\circ}$ C（10分）

注入口温度：250 $^{\circ}$ C

検出器温度：300 $^{\circ}$ C

キャリアーガス：ヘリウム

検出器ガス流量：空気及び水素の流量を至適条件に調整する。

注入量：1 μ L

保持時間の目安：10分

GC-MS

カラム：DB-5MS 内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m

カラム温度：50℃（1分）－25℃/分－125℃（0分）－10℃/分－300℃（10分）

注入口温度：250℃

キャリアーガス：ヘリウム

イオン化モード（イオン化エネルギー）：EI（70 eV）

主なイオン（ m/z ）：189、160、132、128

保持時間の目安：8分

6. ゲル浸透クロマトグラフィー条件

カラム：CLNpak EV-G（20 mm i.d. x 100 mm）+CLNpak EV-2000（20 mm i.d. x 300 mm）、昭和電工（株）

移動相：アセトン・シクロヘキサン（1：4）

カラム温度：40℃

流速：5 mL/min

注入量：5 mL

分取範囲：アクリナトリンの保持時間からトリシクラゾールの溶出終了まで。

[結果]

1. 抽出及び濃縮操作

農産物対象の GC/MS 一斉分析法及び LC/MS 一斉分析法、並びに畜水産物対象の GC/MS 一斉分析法及び LC/MS 一斉分析法の平成 15・16 年度検討結果より、EPTC は牛筋肉、牛脂など固体の試料から脂肪と一緒に抽出するアセトン・ヘキサン混液抽出法では判定 A（平均回収率の中央値が 70%以上、120%以下）である。しかし牛乳など液状の試料を対象としたアセトニトリル抽出法では判定 C（平均回収率の中央値が 50%未満）である。特にはちみつでは 7~27%の低い回収率を示している。

EPTC の抽出法としては農産物を対象とした個別分析法「EPTC 試験法」に通知されているが、アセトン抽出後に濃縮し、ヘキサン・酢酸エチル混液による転溶等の操作が必要となる。GC/MS による一斉分析（畜水産物）のアセトン・ヘキサン混液による抽出法では、牛肉などの固体試料でほぼ良好な結果が得られている。そのため、牛乳、鶏卵及びはちみつの液体試料についてもアセトン・ヘキサン混液での抽出を検討することとした。検討した食品で、抽出操作はほぼ良好であったが、牛乳の場合に、2 回目のヘキサン抽出で有機層がゲル状になるケースが見られたため、1 回目の抽出溶媒のアセトン・ヘキサン（1：2）のアセトンの比率を下げたアセトン・ヘキサン（1：4）50 mL で 2 回目の抽出を行うことにより良好な分離が可能であった。

減圧濃縮では、EPTC の蒸気圧が 1×10^4 mPa/25℃と高く（DDVP は 2100

mPa/25°C)、揮発性が高いため減圧濃縮や窒素気流下での溶媒除去の過程での損失が考えられる。実際、標準溶液を用いて減圧濃縮による乾固で約 50% 程度の損失が認められた (表 1)。実際の試料では脂肪など多様なマトリックスが共存するため損失はある程度防げる可能性があるが、食品によっては濃縮乾固による回収率の低下は起こるものと考えられる。そのため抽出液の減圧濃縮と窒素気流下での溶媒除去操作による損失を抑えるため、キーパーの添加を検討した。

厚生労働省通知の「ジクロベニル試験法 (農産物)」でキーパーとして 2% ジエチレングリコール・アセトン溶液が使用されている。EPTC 標準溶液を用い、キーパー添加量により減圧濃縮及び溶媒除去操作での回収を求めたところ、2 mL 以上の添加でおおむね 98% の回収が得られた (表 2)。本分析法では、アセトン・ヘキサン抽出後に脂肪含量を測定するため溶媒の留去が必要となる (ハチミツを除く)、そのため抽出液にキーパーを 2 mL 加え減圧濃縮して、約 2 mL まで抽出液を残し、窒素気流下で溶媒を除く操作を実施することとした。

2. 精製操作

1) GPC による精製

GC/MS による一斉分析法の GPC による精製を用いた。牛肝臓の試料についても牛筋肉等と同様の分画 (アクリナトリン及びトリシクラゾールの 5 mg/L の混合溶液を注入後、254 nm でモニターしアクリナトリンの保持時間からトリシクラゾールが溶出終了する時間を分取範囲) を採り、フロリジルミニカラム精製により得られた試験溶液を GC -NPD で測定したところ、妨害ピークによる影響が見られなかったため、GPC の分取条件を同一とした。また分画液の減圧濃縮では約 2 mL まで濃縮し、乾固せずに次の操作を行うこととした。

2) フロリジルミニカラムによる精製

厚生労働省通知の EPTC 試験法 (農産物) ではフロリジルオープンカラムによる精製を用いている。その操作としてはヘキサンで負荷し、エーテル・ヘキサン混液 (1 : 99) で洗い、捨てる、次にエーテル・ヘキサン混液 (3 : 7) で溶出する方法で、色素などの夾雑物の除去に有効であるためフロリジルでの精製を検討した。今回の検討では、溶媒の使用量を減らし、操作の簡便化を図るためフロリジル 1,000mg が充てんされた、カートリッジカラム (6 mL) の使用を検討した。EPTC をヘキサンで負荷後、エーテル・ヘキサン混液 (3 : 7) での溶出を観察したところ、5 mL で 99% が溶出した (表 3)。また、エーテル・ヘキサン混液 (1 : 99) での洗浄は実試料で検討したところ、夾雑物やクロマトグラム上での妨害の除去には影響がない

ため省略することとした。GPC 分画液を約 2 mL まで濃縮し、ヘキサンを加えカートリッジカラムに負荷し、更にナス形フラスコをヘキサンで洗い込み、次にエーテル・ヘキサン混液 (3 : 7) で溶出し、負荷から溶出まですべてを試験管に採取することとした。

この溶出液をナス形フラスコに入れ、試験管をアセトンで十分に洗いこみ減圧濃縮し約 1 mL まで濃縮し、アセトンで 5.0 mL に定容し試験溶液とした。脂肪など濃縮倍率が低くなる試料では適宜定容量を少なくして試験溶液とした。

3. GC-NPD 測定

GC の測定条件は「EPTC 試験法」の測定条件に準拠した。保持時間は約 10 分で良好な形状のピークが得られた。

4. 添加回収試験

試料中濃度として 0.02 及び 0.1 mg/kg (試料 20 g に対し 1.0mg/L 標準アセトン溶液 0.4 及び 2.0 mL)、脂肪については試料中濃度として 0.04 及び 0.1 mg/kg (試料 5 g に対し 1.0 mg/L 標準アセトン溶液 0.2 及び 0.5 mL) となるように添加し、30 分放置後、試料調製を行った。抽出により得た試料中の脂肪量が 10% を超える場合には、GPC への脂肪負荷量を 0.50 g 以下となるように GPC 移動相で一定量に溶解し負荷した。このときの各試料の GPC への負荷量等を表 4 に示した。回収率は 71.5%~93.1%、相対標準偏差は 2.4~9.9 (表 5) と良好な結果が得られた。

本法の定量限界は 0.01 mg/kg、脂肪では 0.02 mg/kg であった。標準溶液、無添加及び標準品添加試料のクロマトグラムを図 1~11 に示した。

5. 確認試験

GC-MS を用いて確認を実施した。測定条件は GC-MS による農薬等の一斉試験法 (畜水産物) に準拠した。EPTC 標準溶液 (0.02 ppm) のマススペクトル及び添加回収試験で得られた主な試料の試験溶液のマススペクトルを図 12 に示した。

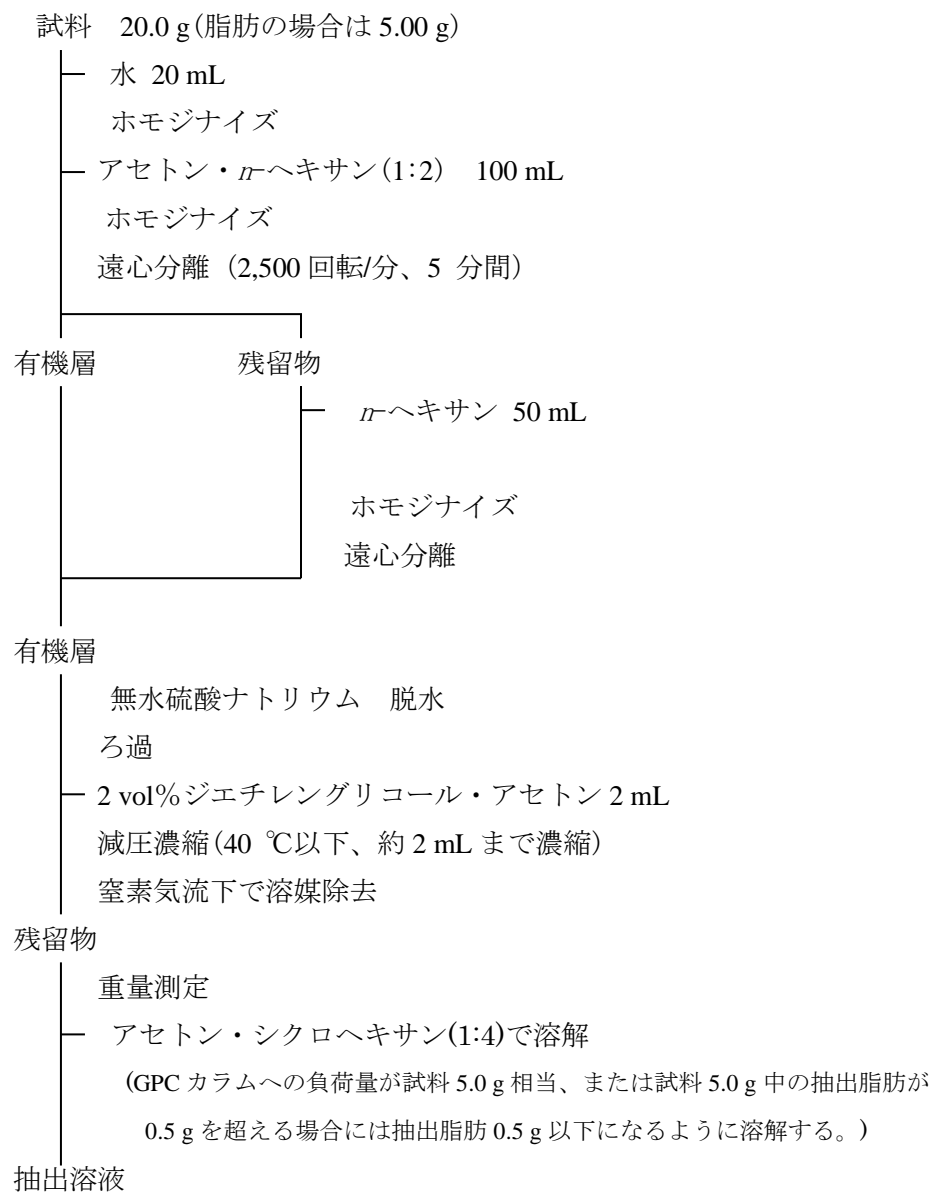
6. マトリックス効果

無添加試料の試験溶液 200 μ L (牛脂肪は 100 μ L) を窒素気流下で溶媒を除き、同量の 0.10 ppm 標準溶液で溶解後、GC-NPD にて測定した。標準溶液との測定結果を比較した (表 6) ところ、マトリックスによるピーク面積の増減はほとんど見られず、本法により得られたマトリックスによる測定値への影響はほとんど無視できるものと考えられる。

EPTC 試験法のフローチャート

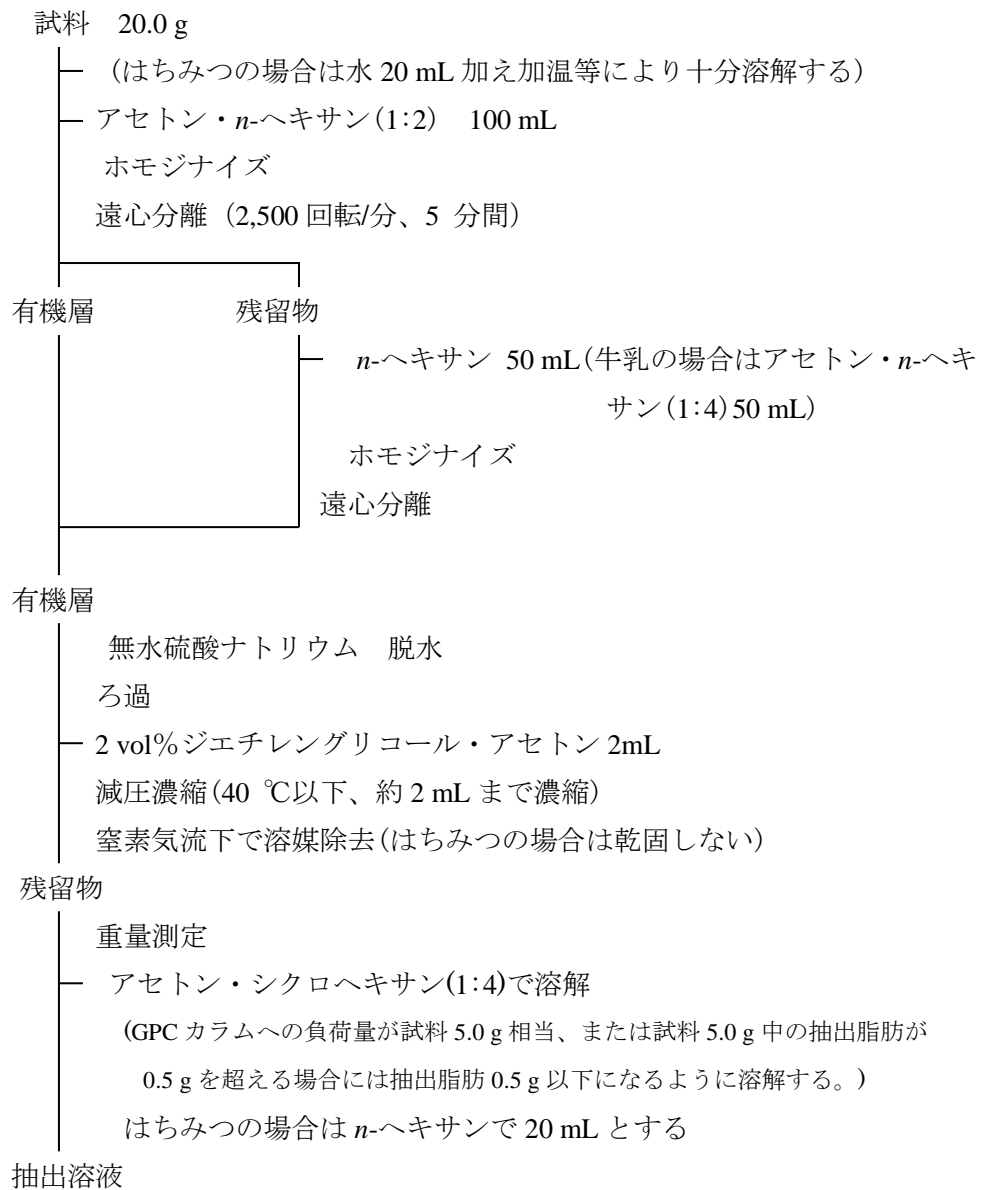
[抽出操作]

筋肉、脂肪、肝臓及び魚介類の場合



[抽出操作]

乳、卵及びはちみつの場合



[精製操作]

筋肉、脂肪、肝臓、魚介類、乳及び卵の場合

抽出溶液

遠心分離(3,000 回転/分、5 分間)

上澄液 5 mL を負荷

GPC

分画

(アクリナトリン保持時間～トリシクラゾール溶出終了時間)

GPC 農薬分画液

減圧濃縮(40 °C以下、約 2 mL まで濃縮)

n-ヘキサン 5 mL 加え溶解

フロリジルミニカラム(あらかじめエーテル 5 mL、*n*-ヘキサン 15 mL で洗浄)

負荷(*n*-ヘキサン 1 mL で 2 回洗い込む)

エーテル・*n*-ヘキサン(3:7)5 mL で溶出

溶出液

アセトン 5 mL で 3 回洗い込む

減圧濃縮(40 °C以下、約 1 mL まで濃縮)

アセトンで 5 mL に定容する

(脂肪等 GPC の負荷量により定容量を変更)

試験溶液

【精製操作】

はちみつの場合

抽出溶液 5 mL

フロリジルミニカラム(あらかじめエーテル 5 mL、*n*-ヘキサン 15 mL で洗浄)

負荷(*n*-ヘキサン 1 mL で 2 回洗い込む)

エーテル・*n*-ヘキサン(3:7)5 mL で溶出

溶出液

アセトン 5 mL で 3 回洗い込む

減圧濃縮(40 °C 以下、約 1 mL まで濃縮)

アセトンで 5 mL に定容

試験溶液

表 1. 減圧濃縮操作による EPTC の残存率

(単位%, n=2)

濃縮(乾固) ¹	濃縮(窒素気流乾固) ²	濃縮(乾固なし) ³
49.5	56.3	97.7

アセトン・ヘキサン(1:2)100mL+ヘキサン50mLに
標準溶液(1 μg/mL)0.5mLを添加、各濃縮操作後
アセトンで定容(5mL)

- 1: 減圧濃縮で溶媒を留去(乾固)
- 2: 減圧濃縮で溶媒を約2mL残し窒素気流下で乾固
- 3: 減圧濃縮で溶媒を約2mL残し乾固しない

減圧濃縮条件(160 Torr、40°C)

表 2. キーパーの添加量による EPTC の残存率

(単位%, n=2)

添加量(mL)				
0	0.5	1.0	2.0	3.0
56.3	66.0	85.4	97.8	97.7

アセトン・ヘキサン(1:2)100mL+ヘキサン50mLに標準溶液(1 μg/mL)0.5mL及びキーパーを添加。約2mLまで減圧濃縮後、窒素気流下で乾固しアセトンで5mLに定容し測定。

表 3. フロリジルカラムから EPTC の回収率

(n=2)

エーテル・ヘキサン(3:7)	0~1	1~3	3~5	5~7 mL
回収率(%)	0	87.8	11.3	0

EPTC標準溶液(1 μg/mLヘキサン)1.0mLとヘキサン2mLで負荷後、
エーテル・ヘキサン(3:7)で溶出

表 4. 添加回収試験における各試料の脂肪量及び GPC 負荷量

	牛筋肉	牛脂肪	牛肝臓	豚筋肉	サケ	うなぎ	しじみ	牛乳	鶏卵
粗脂肪量(%)	3.6~5.4	83.0~90.9	4.4~5.4	1.8~2.5	8.5~9.9	17.8~19.8	1.2~1.7	3.0~3.3	10.8~11.3
試料負荷量(g)	5.0	1.0 (0.5x2)	5.0	5.0	5.0	5.0 (2.5x2)	5.0	5.0	4.0
最終液量(mL)	5.0	2.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	4.0

粗脂肪量: 無添加試料及び添加試料の抽出後の残留物の重量%の範囲を示した。
 試料負荷量: GPCへの粗脂肪量が0.50 gを超えないように、試料負荷量を調整(はちみつについてはGPCを実施しない)。
 最終液量: 試験溶液の最終液量を示した。

表 5. EPTC の添加回収試験

	牛筋肉	牛脂肪	牛肝臓	豚筋肉	サケ	うなぎ	しじみ	牛乳	鶏卵	はちみつ
0.02 ppm 添加 (牛脂肪は0.04 ppm)										
n=5	95.3	96.8	85.6	67.0	80.5	84.3	76.8	70.4	72.6	87.9
	80.1	89.1	92.6	79.6	87.2	81.3	64.4	66.5	76.9	90.4
	87.8	91.4	90.7	81.5	93.3	98.1	82.8	81.7	72.1	93.2
	85.3	92.0	89.8	76.5	83.9	84.6	70.3	67.5	73.0	92.4
	93.0	96.0	90.3	73.8	85.9	91.6	78.2	77.9	73.2	92.7
平均回収率(%)	88.3	93.1	89.8	75.7	86.2	88.0	74.5	72.8	73.6	91.3
RSD	6.9	3.5	2.9	7.5	5.5	7.7	9.7	9.2	2.6	2.4
0.10 ppm 添加										
n=5	84.9	71.5	95.9	74.0	85.0	90.8	68.9	88.1	94.3	85.2
	82.5	82.5	84.1	72.2	85.4	97.0	89.2	75.4	78.7	89.8
	73.4	85.5	84.9	72.8	92.4	87.8	84.5	72.7	84.3	84.8
	83.7	79.1	90.3	73.1	86.8	95.4	76.8	81.4	86.5	82.7
	79.4	82.6	90.4	65.0	88.0	89.9	76.4	81.1	89.5	85.0
平均回収率(%)	80.8	80.2	89.1	71.5	87.5	92.2	79.2	79.7	86.7	85.5
RSD	5.7	6.7	5.4	5.1	3.4	4.2	9.9	7.5	6.7	3.1

各試料につきEPTCを0.02 ppm相当(脂肪は0.04ppm)及び0.10ppm相当添加、30分放置後、試料調製を実施。

表 6. 試料マトリックス添加による EPTC のピーク面積の変化

	牛筋肉	牛脂肪	牛肝臓	豚筋肉	サケ	うなぎ	しじみ	牛乳	鶏卵	はちみつ
面積比 (A/B)	1.01	1.04	1.04	1.03	0.99	0.99	1.02	1.00	1.01	1.04

A: マトリックス添加標準溶液の面積(n=2)

B: 標準溶液の面積(n=2)

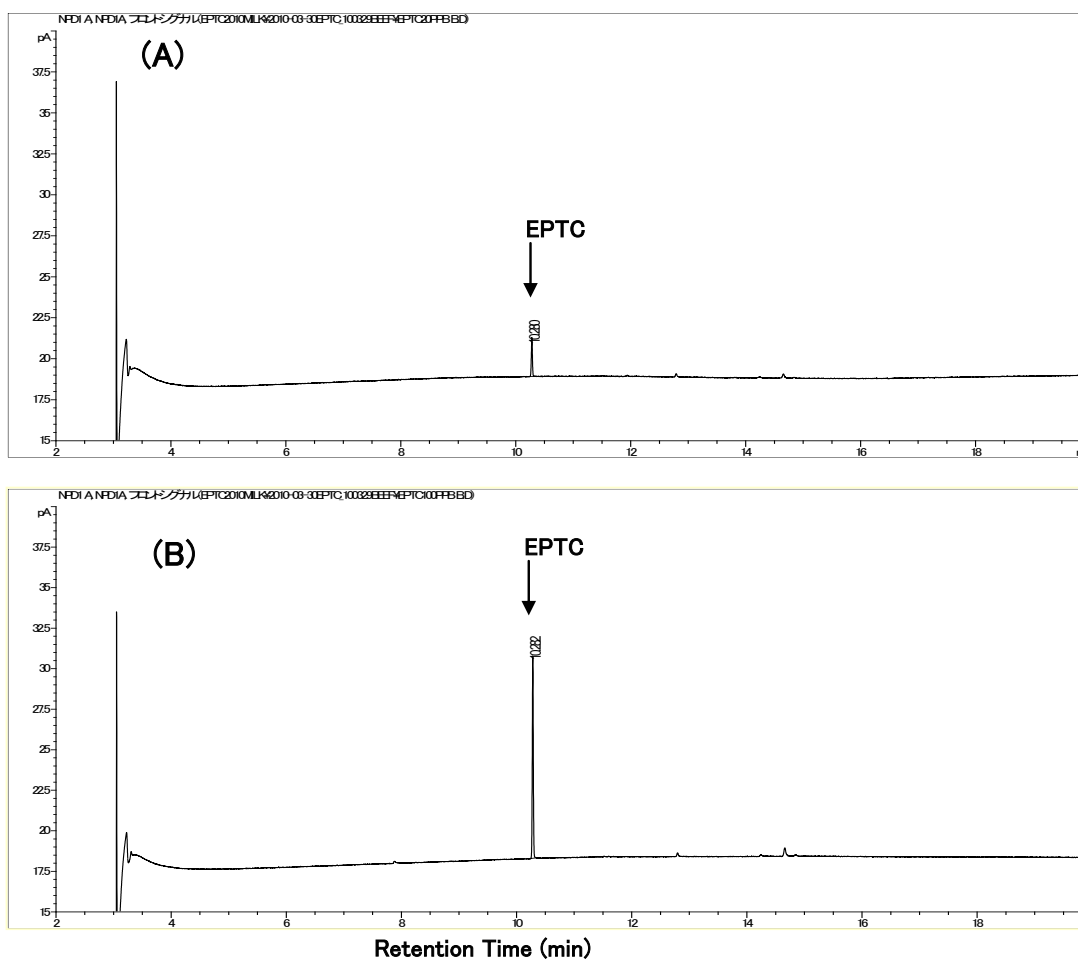


図 1. EPTC 標準溶液のガスクロマトグラム

A : 標準溶液(0.02 mg/L)

B : 標準溶液(0.10 mg/L)

検出器 : NPD

カラム : DB-5 内径 0.25 mm、長さ 30m、膜厚 0.25 μ m

カラム温度 : 60 $^{\circ}$ C(2分)- 15 $^{\circ}$ C/分-200 $^{\circ}$ C(2分)-5 $^{\circ}$ C/分-280 $^{\circ}$ C(10分)

注入口温度 : 250 $^{\circ}$ C

検出器温度 : 300 $^{\circ}$ C

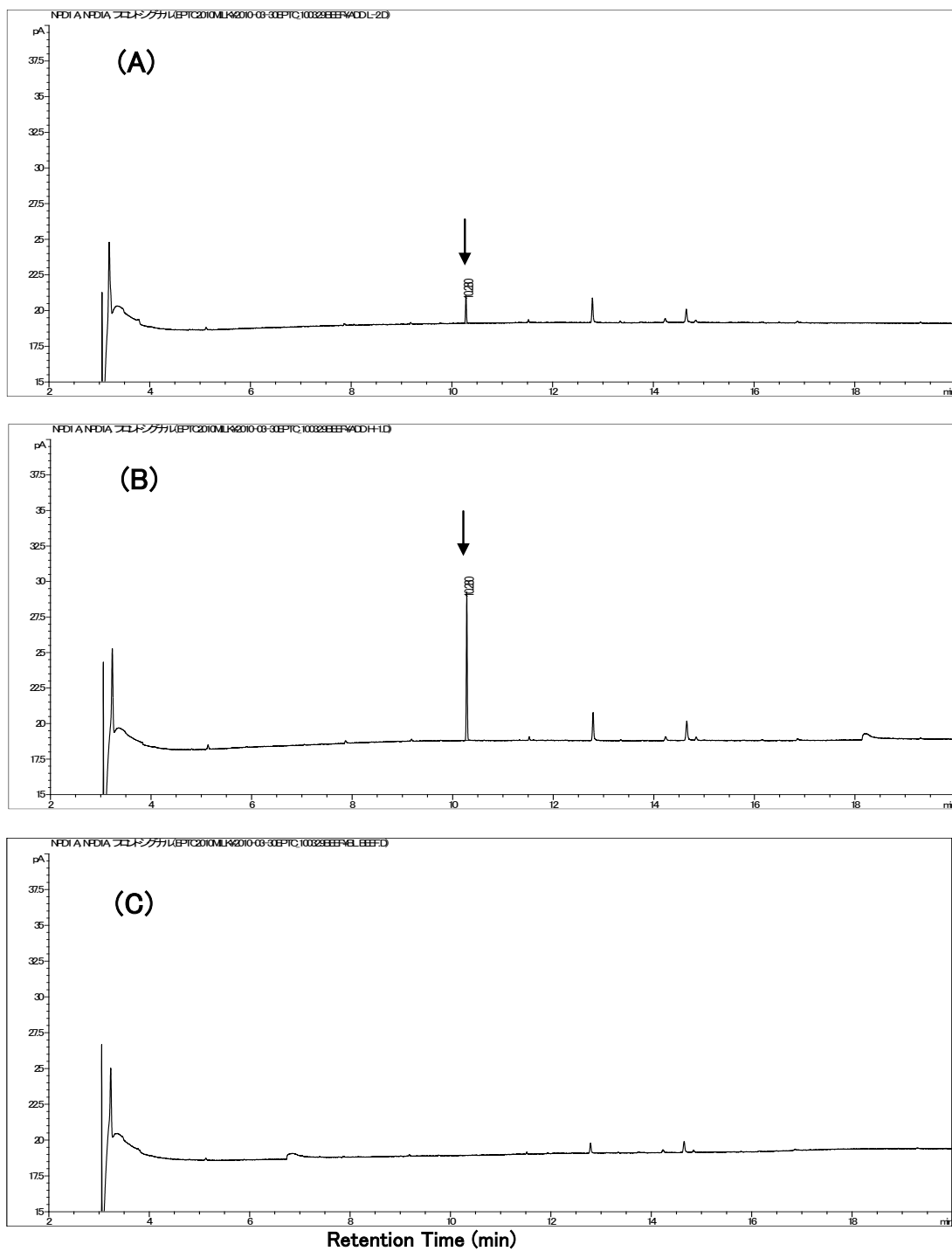


図2. 牛筋肉試験溶液のガスクロマトグラム

A : 添加試料(0.02 ppm 相当 ; 試料 20 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 0.4 mL 添加)

B : 添加試料(0.1 ppm 相当 ; 試料 20 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 2.0 mL 添加)

C : 無添加試料

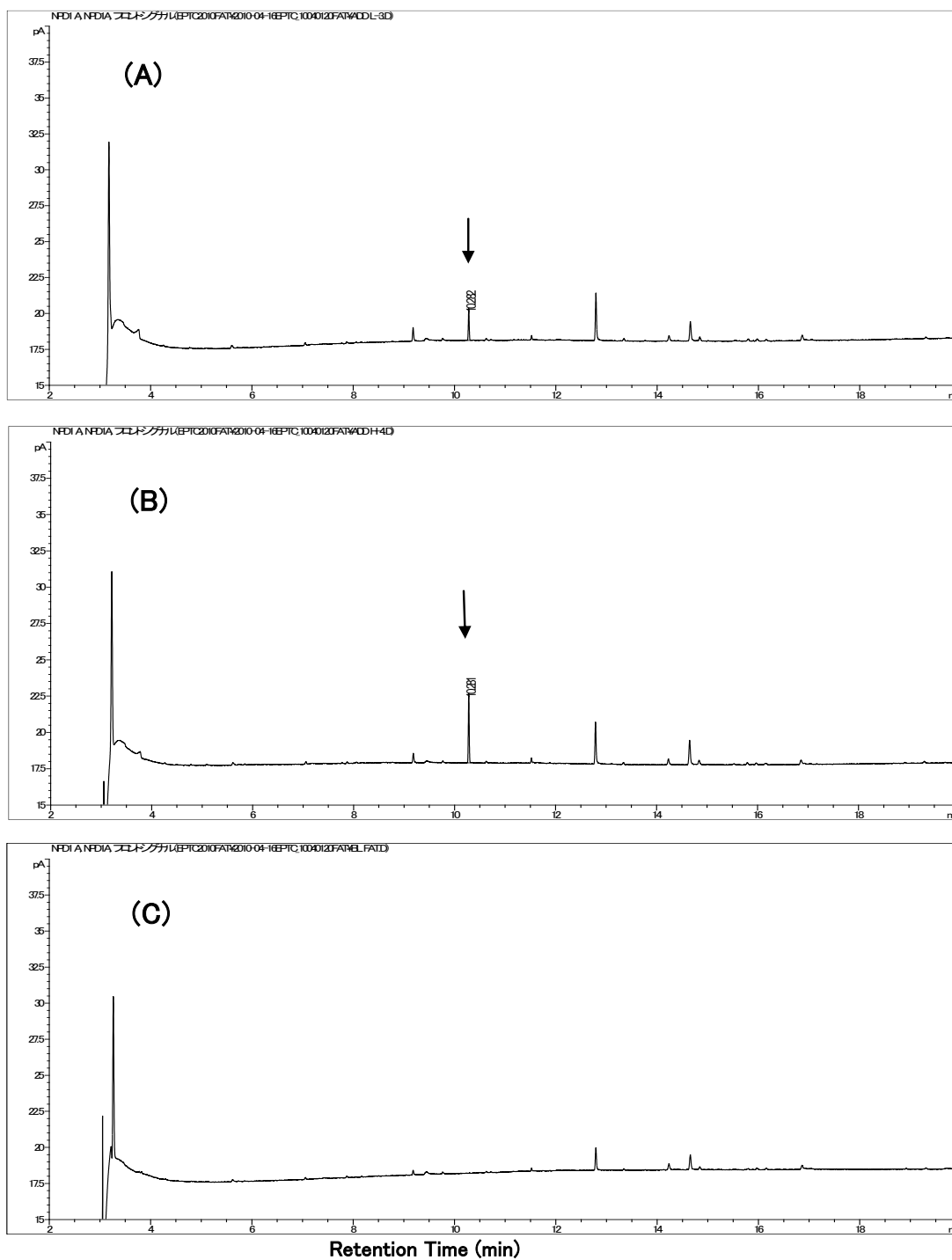


図3. 牛脂肪試験溶液のガスクロマトグラム

- A : 添加試料(0.04 ppm 相当 ; 試料 5.0 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 0.2 mL 添加)
- B : 添加試料(0.1 ppm 相当 ; 試料 5.0 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 0.5 mL 添加)
- C : 無添加試料

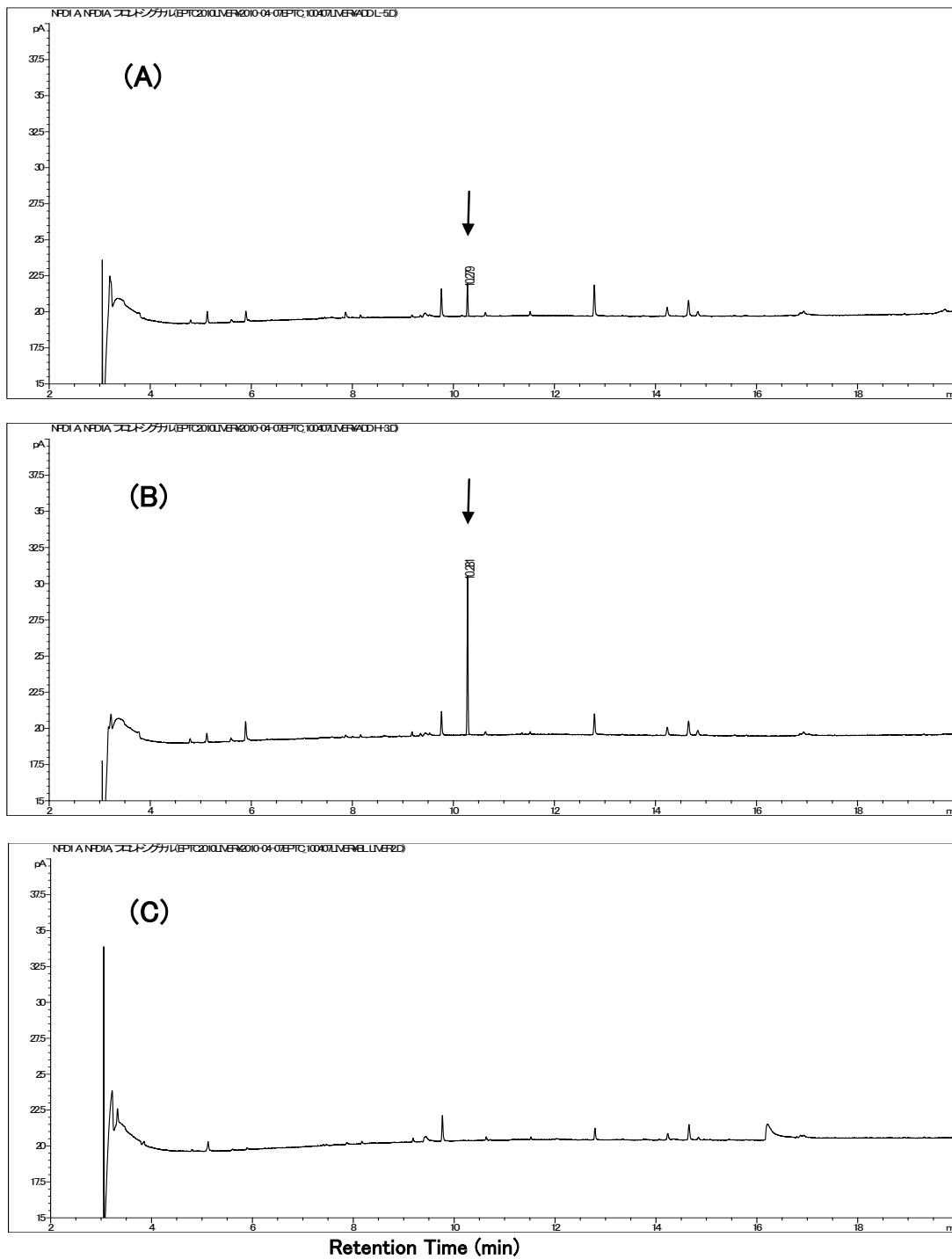


図4. 牛肝臓試験溶液のガスクロマトグラム

A : 添加試料(0.02 ppm 相当 ; 試料 20 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 0.4 mL 添加)

B : 添加試料(0.1 ppm 相当 ; 試料 20 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 2.0 mL 添加)

C : 無添加試料

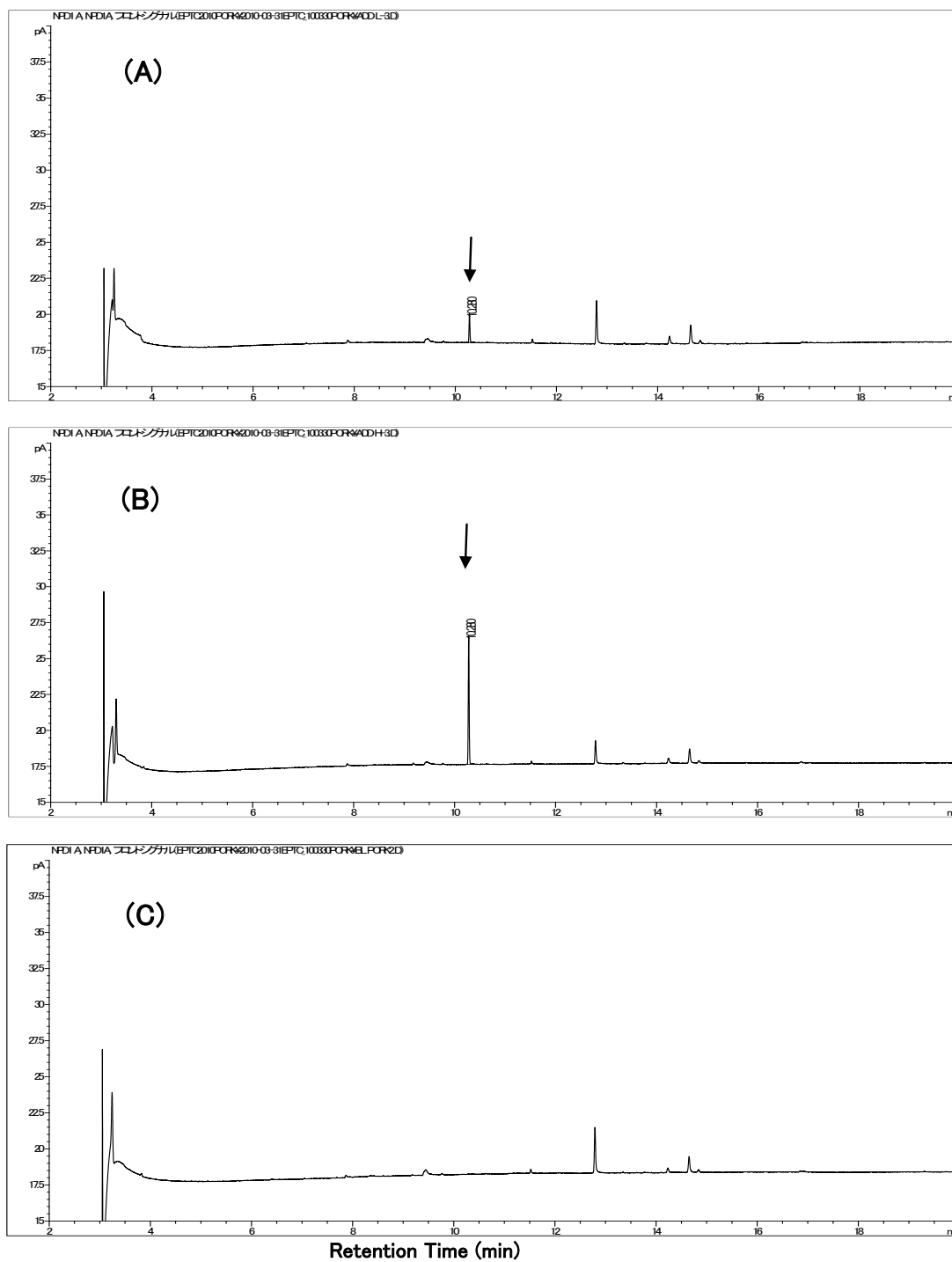


図5. 豚筋肉試験溶液のガスクロマトグラム

A : 添加試料(0.02 ppm 相当 ; 試料 20 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 0.4 mL 添加)

B : 添加試料(0.1 ppm 相当 ; 試料 20 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 2.0 mL 添加)

C : 無添加試料

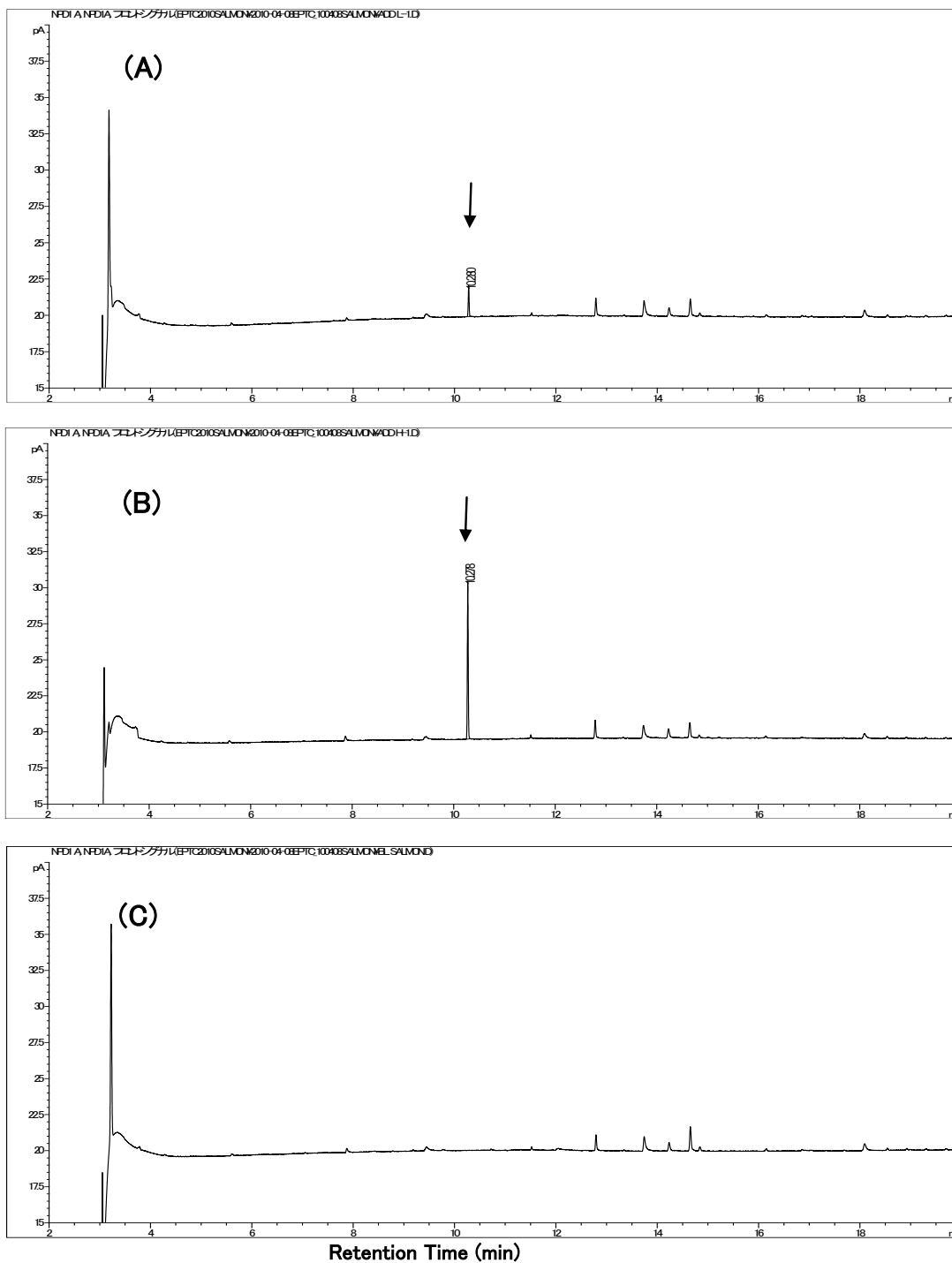


図6. サケ試験溶液のガスクロマトグラム

A : 添加試料(0.02 ppm 相当 ; 試料 20 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 0.4 mL 添加)

B : 添加試料(0.1 ppm 相当 ; 試料 20 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 2.0 mL 添加)

C : 無添加試料

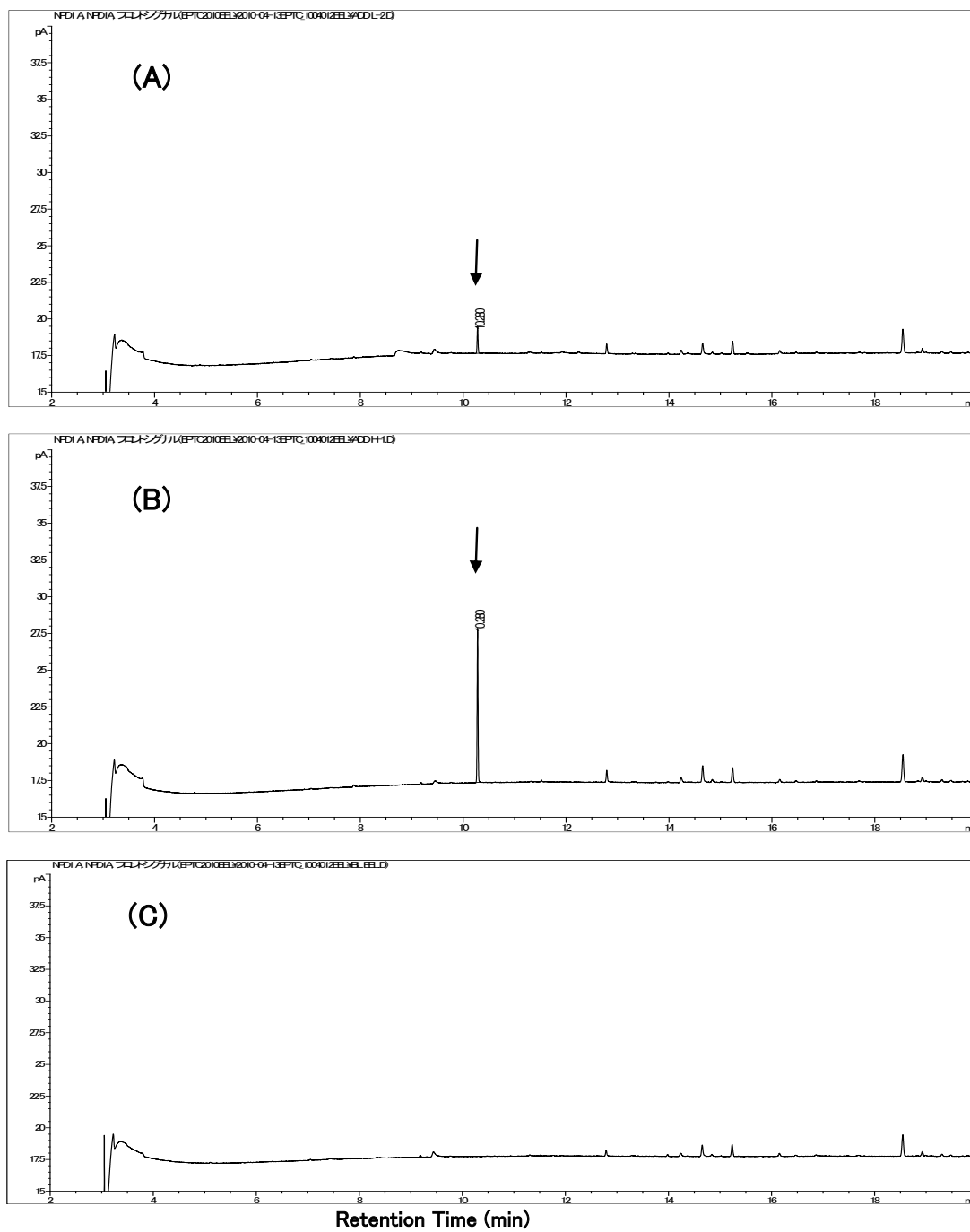


図7. うなぎ試験溶液のガスクロマトグラム

A : 添加試料(0.02 ppm 相当 ; 試料 20 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 0.4 mL 添加)

B : 添加試料(0.1 ppm 相当 ; 試料 20 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 2.0 mL 添加)

C : 無添加試料

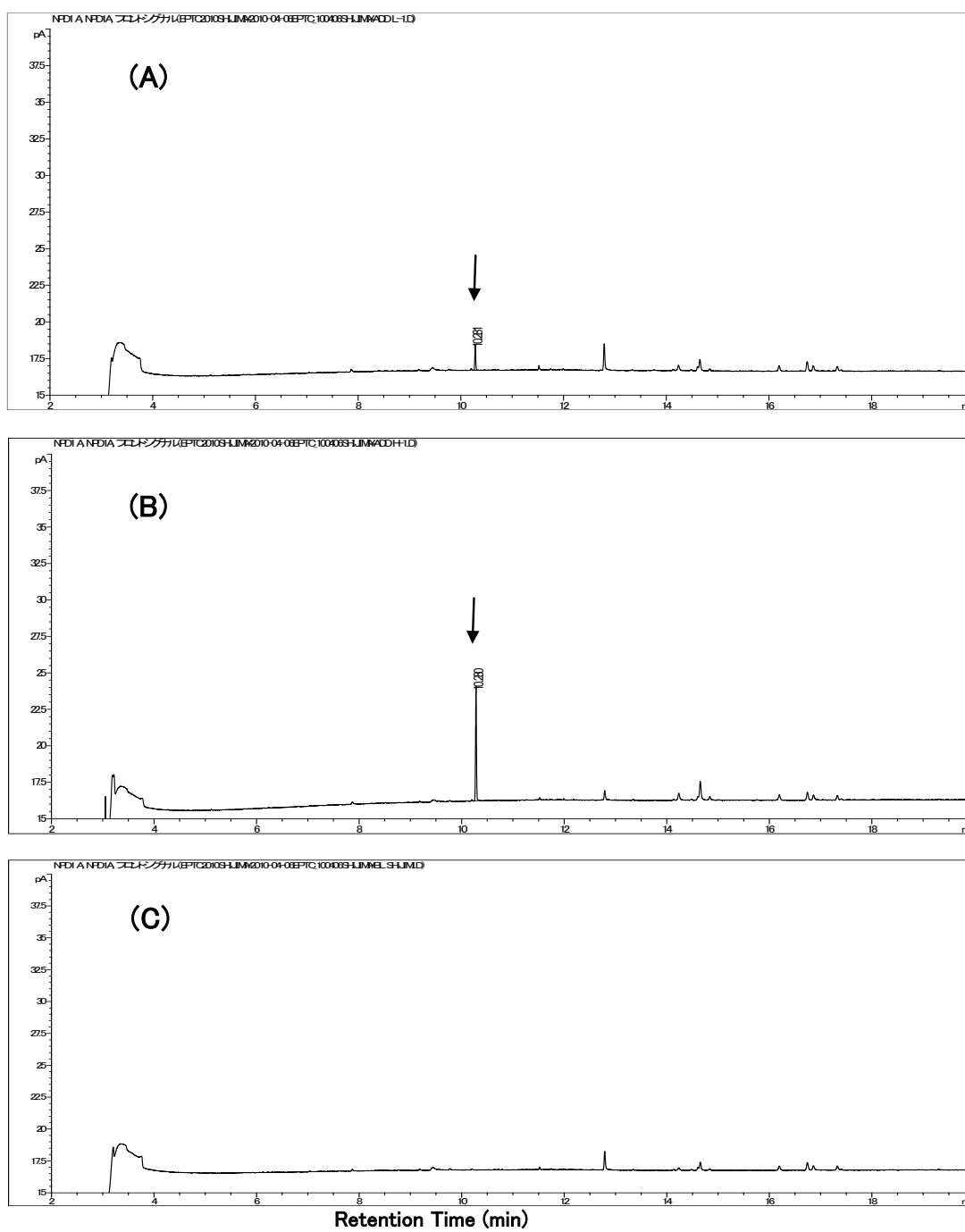


図8. しじみ試験溶液のガスクロマトグラム

- A : 添加試料(0.02 ppm 相当 ; 試料 20 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 0.4 mL 添加)
- B : 添加試料(0.1 ppm 相当 ; 試料 20 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 2.0 mL 添加)
- C : 無添加試料

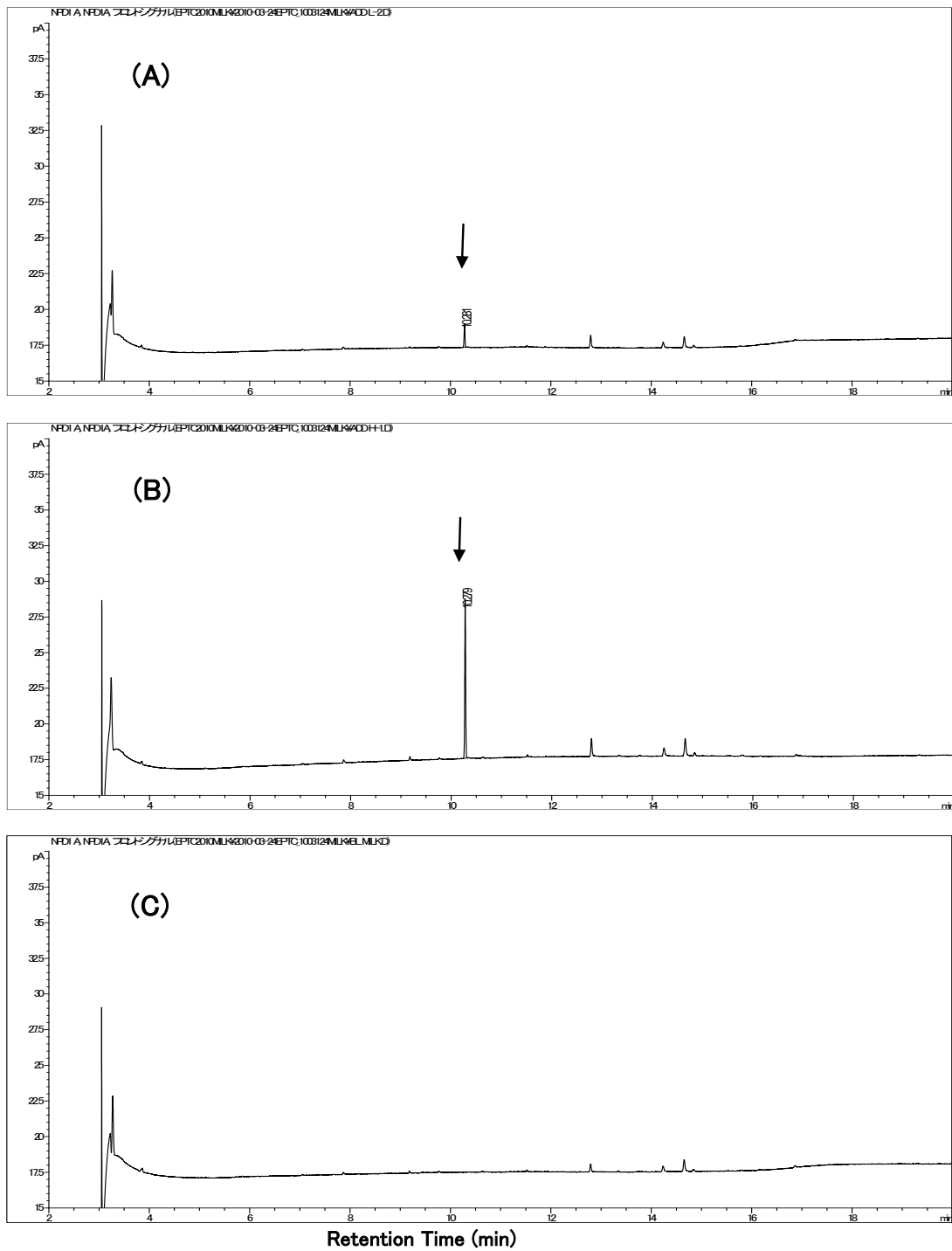


図9. 牛乳試験溶液のガスクロマトグラム

A : 添加試料(0.02 ppm 相当 ; 試料 20 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 0.4 mL 添加)

B : 添加試料(0.1 ppm 相当 ; 試料 20 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 2.0 mL 添加)

C : 無添加試料

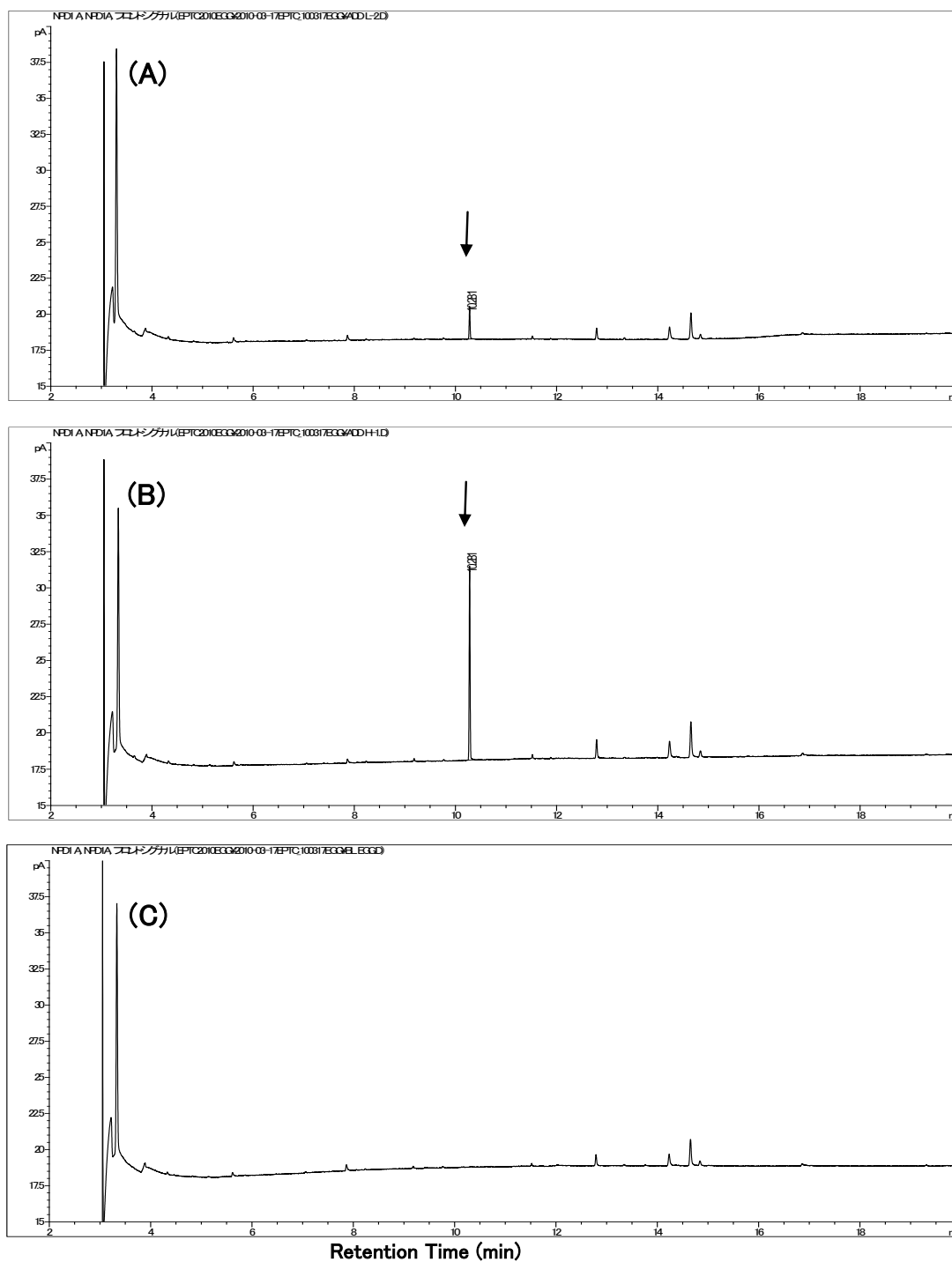


図 10. 鶏卵試験溶液のガスクロマトグラム

A : 添加試料(0.02 ppm 相当 ; 試料 20 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 0.4 mL 添加)

B : 添加試料(0.1 ppm 相当 ; 試料 20 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 2.0 mL 添加)

C : 無添加試料

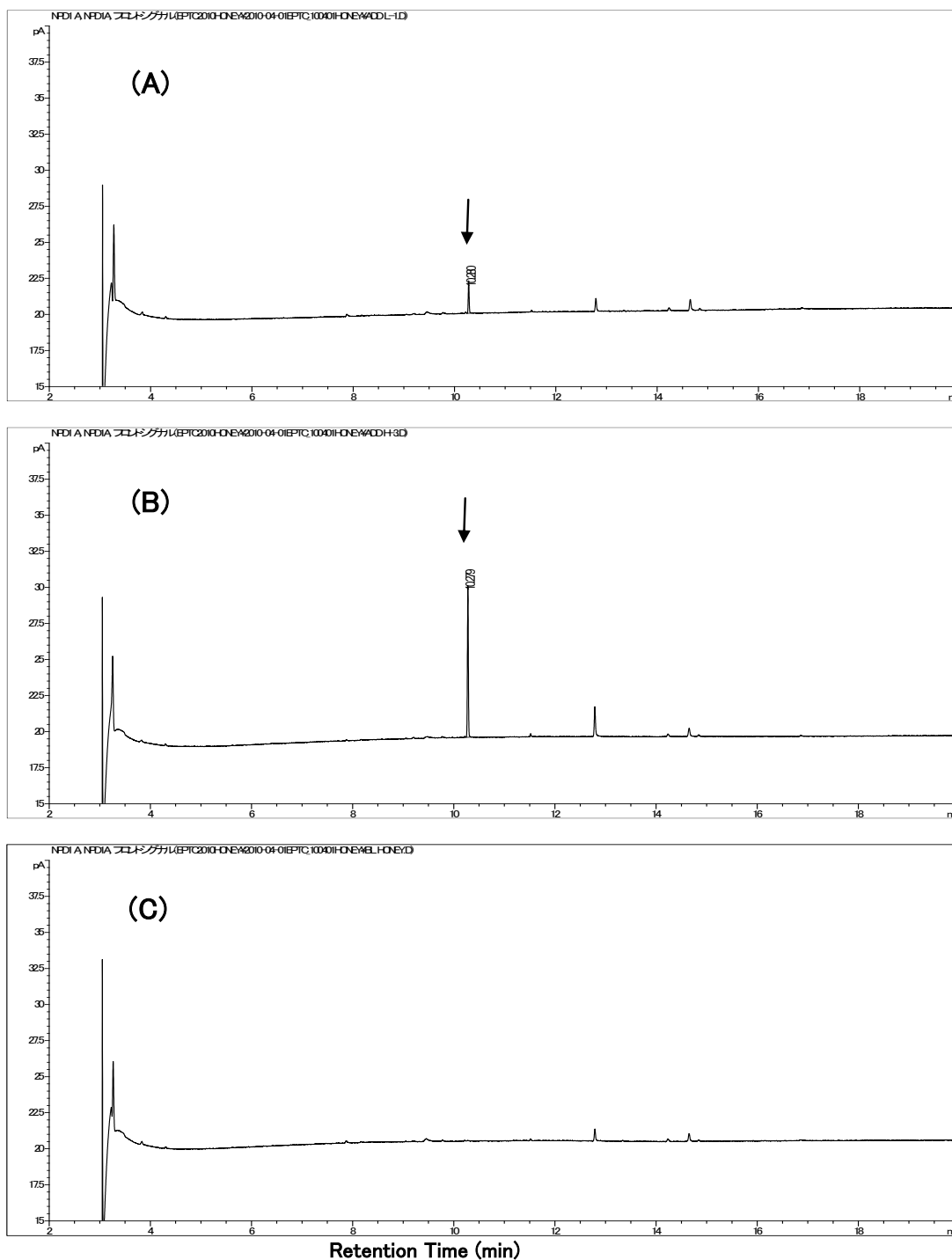


図 1 1. はちみつ試験溶液のガスクロマトグラム

- A : 添加試料(0.02 ppm 相当 ; 試料 20 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 0.4 mL 添加)
- B : 添加試料(0.1 ppm 相当 ; 試料 20 g に標準溶液(1.0 mg/L)を 2.0 mL 添加)
- C : 無添加試料

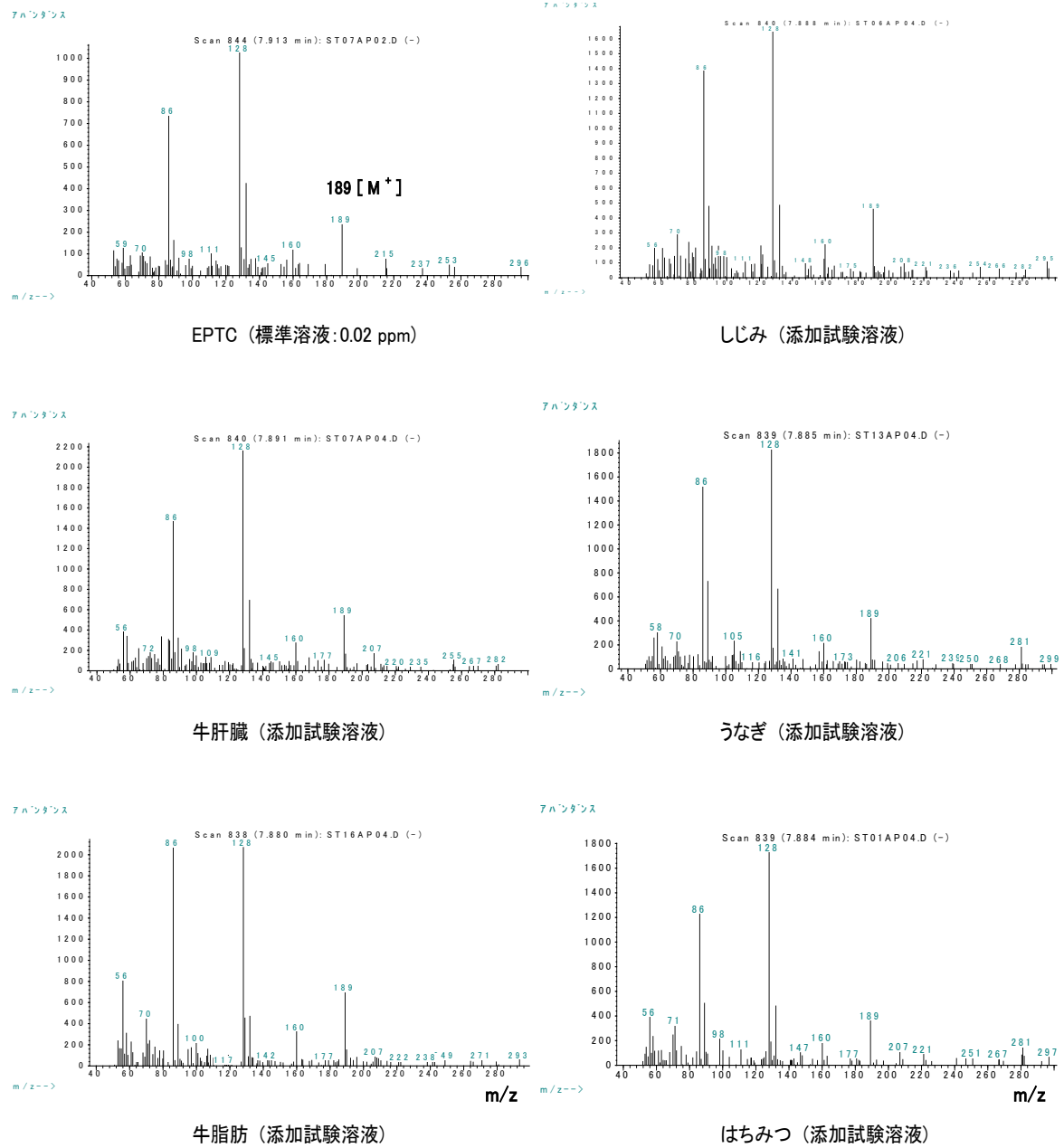


図 1 2. EPTC 標準溶液及び標準品添加試料の試験溶液のマススペクトル
 EPTC 標準溶液 : 0.02ppm
 最終試験溶液 : 0.02ppm 相当